



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής  
και Αγροτικού Περιβάλλοντος**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Αρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες εφαρμόζεται με ψεκασμό σε  
καλλιέργεια σπανακιού (*Spinacia oleracea* L.): επιδράσεις σε μορφο-  
ανατομικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού**

**ΤΣΟΥΜΑΛΑΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ**

**Βόλος, 2017**

Αρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες εφαρμόζεται με ψεκασμό σε καλλιέργεια  
σπανακιού (*Spinacia oleracea* L.): επιδράσεις σε μορφο-ανατομικά χαρακτηριστικά και  
φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού  
ΤΣΟΥΜΑΛΑΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Λεβίζου Ευθυμία	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια.
Κορμάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής Οικολογίας Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.
Παυλή Ουρανία	Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Copyright © ΤΣΟΥΜΑΛΑΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ, 2017.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο «Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος» της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν «Αρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες εφαρμόζεται με ψεκασμό σε καλλιέργεια σπανακιού (*Spinacia oleracea* L.): επιδράσεις σε μορφο-ανατομικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού.»

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της εργασίας αυτής Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ευθυμία Λεβίζου για την πολύτιμη βοήθειά της, την υποστήριξη και καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την εμπιστοσύνη, την άποψη συνεργασία, την αδιάκοπη βοήθεια και καθοδήγηση και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ουρανία Παυλή για την καλή διάθεση και τις συμβουλές που μου προσέφερε στη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Θα ήταν παράληψη μου να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την βοήθεια του και τον χρόνο που διέθεσε κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φοιτητές του εργαστηρίου ζιζανιολογίας, προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς και ιδιαίτερα, την Ραφαηλία, τον Στράτο, τον Θάνο και την Μαρία για τις συμβουλές και τη βοήθεια τους, για την καλή διάθεση και το όμορφο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην οικογένειά μου, στον Χρήστο και στον Charlie που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου βήμα, δείχνοντας κατανόηση και αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα καλλιέργεια σπανακιού (*Spinacia oleracea* L.) ποτίστηκε με νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες με σκοπό την μελέτη των επιδράσεων του σε μορφολογικές, ανατομικές και φυσιολογικές παραμέτρους των φυτών, όταν παρέχεται στα φυτά με ψεκασμό ή ριζοπότισμα. Το επιβαρυμένο νερό συλλέχθηκε από τη λίμνη Κάρλα, η οποία χαρακτηρίζεται από ευτροφικές συνθήκες και αυξημένες συγκεντρώσεις μικροκυστινών που έχουν ηπατοτοξική δράση. Κατά την πειραματική διαδικασία, τα φυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες, σε αυτά που λάμβαναν επιβαρυμένο νερό (ομάδα Κάρλα) με ριζοπότισμα ή ψεκασμό (ΚΡ και ΚΨ αντίστοιχα) και σε αυτά που λάμβαναν νερό από το δίκτυο ύδρευσης (ομάδα Βρύση) με τις ίδιες μεθόδους ποτίσματος (ΒΡ και ΒΨ). Η πειραματική διαδικασία διήρκησε τρεις μήνες, καλύπτοντας την αναπτυξιακή περίοδο του σπανακιού από τη φύτευση του σπέρματος έως τη συγκομιδή στο εμπορεύσιμο μέγεθος. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών στις ομάδες της βρύσης σε σχέση με αυτές της Κάρλας καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Οι τελικές μετρήσεις και η στατιστική ανάλυση έδειξαν ότι υπήρξε αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων (είδους νερού και μεθόδου ποτίσματος) στο νωπό βάρος, το ξηρό βάρος ρίζας, τις επιφάνειες των φύλλων και τη συνολική βιομάζα. Πράγματι, ο ψεκασμός οδήγησε σε βελτιωμένη εικόνα τα φυτά της Κάρλας (ΚΨ) σε σχέση με τα ΚΡ, ενώ αντίθετη ήταν η επίδραση του στα φυτά της Βρύσης (ΒΨ) που εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη σε σχέση με τα ΒΡ. Σε ότι αφορά τις βιοχημικές παραμέτρους, οι ομάδες ΚΡ και ΚΨ εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές χλωροφύλλης α. Η μέτρηση των ολικών φαινολικών ήταν η μόνη που επηρεάστηκε από τη μέθοδο ποτίσματος και οι ομάδες που ποτίστηκαν στη ρίζα παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών από τις ομάδες που ποτίστηκαν με ψεκασμό. Η πυκνότητα των στομάτων παρουσίασε διαφορετικό πρότυπο για την πάνω και κάτω επιφάνεια του φύλλου. Στην πάνω επιφάνεια υπήρχε τάση για περισσότερα και μικρότερα στόματα στο ΚΡ σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, ενώ στην κάτω επιφάνεια οι ομάδες της Βρύσης είχαν σημαντικά περισσότερα στόματα. Τέλος, σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις (2-6 φορές) προσκολλημένων βακτηρίων καταγράφηκαν στις επιφάνειες των φύλλων στις ομάδες όπου χορηγήθηκε νερό από τη λίμνη Κάρλα, με τα φυτά ΚΨ να υπερέχουν φτάνοντας τα 12,5 εκ. βακτήρια ανά τετραγωνικό εκατοστό επιφάνειας φύλλου, ενώ οι τιμές περιορίστηκαν στα 3 εκ. για τις δύο ομάδες της βρύσης.

## ABSTRACT

The effects of cyanotoxins-rich irrigation water on morpho-anatomical and physiological parameters of spinach were investigated with plants receiving spray and root irrigation. The degraded water was collected from the Karla Lake, which is characterized by eutrophic conditions and increased microcystins concentration. The plants were divided into four groups, i.e. two of them receiving Karla's water to the root (KR) or by spraying (KS) and the corresponding controls receiving tap water (TR and TS). The experimental period lasted for three months, covering the whole growth period from the seed to the final harvest at marketable size. Significant decreases in several growth parameters were recorded at Karla's groups compared to control, throughout the growth period. Measurements at final harvest and the subsequent statistical analysis revealed an interaction between the two independent experimental factors (type of water and irrigation method) on leaves fresh weight, root biomass and whole plant biomass. Indeed, while KS plants showed an improved growth compared with KR, the opposite was evident with the control groups, i.e. TS had an inferior growth compared with TR. Concerning biochemical parameters, KR and KS showed increased chlorophyll a concentration, while total phenolics content was higher in the root irrigated plants (KR and TR), being the only measured parameter that was influenced by irrigation method alone. Stomatal density revealed a differential profile in the adaxial and abaxial leaf surface. In the former, a trend for smaller and more stomata in KR treatment compared to all other treatments was recorded, while in the abaxial surface the two control treatments showed a significantly increased stomatal density. Finally, significantly high bacteria concentrations attached on leaf surface were measured in the two Karla treatments, ranging from 2 to 6 times over corresponding control plants. Spinach sprayed with microcystins-rich water bared more than 12.5 million bacteria per square centimeter of leaf surface, while control plants hardly reached 3 million bacteria.

Εγώ, η Τσουμαλάκου Ευαγγελία, είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ' ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Η Συγγραφέας

Ως επιβλέπουσα της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Τσουμαλάκου Ευαγγελία.

Η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά για τα κυανοβακτήρια .....	1
1.2 Γενικά για τις μικροκυστίδες.....	3
1.3 Μικροκυστίδες και φυτά.....	5
1.4 Επιτρεπτά όρια μικροκυστινών.....	7
1.5 Λίμνη Κάρλα .....	7
1.6 Σκοπός της εργασίας .....	9
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	10
2.1 Αναπτυξιακή περίοδος .....	10
2.2 Τελική συλλογή.....	12
2.3 Μέτρηση συγκέντρωσης φωτοσυνθετικών χρωστικών .....	13
2.4 Μέτρηση προλίνης.....	13
2.5 Μέτρηση ολικών φαινολικών .....	14
2.6 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.....	14
2.7 Στατιστική ανάλυση .....	15
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	16
3.1 Μορφολογικά – αναπτυξιακά χαρακτηριστικά .....	16
3.2 Βιοχημικά χαρακτηριστικά .....	24
3.3 Ανατομικά χαρακτηριστικά.....	26
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	39
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	42
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	43
Ελληνική.....	43
Ξενόγλωσση.....	43
Ηλεκτρονική.....	47

## Λίστα πινάκων

Πίνακας 1. Μετρήσεις νερού και χαρακτηριστικά λίμνης κατά τα έτη 2010-2015 .....	9
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά και σύσταση του εδάφους από το αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .....	11
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών και των μεταξύ τους αναλογιών στα φυτά .....	24

## Λίστα εικόνων

Εικόνα 1. Απεικόνιση κυανοβακτηρίων <i>Tolypothrix</i> .....	1
Εικόνα 2. Αποικίες <i>Nostoc pruniform</i> .....	2
Εικόνα 3. Απεικόνιση κυανοβακτηριακής άνθισης στη λίμνη Erie, Ohio .....	3
Εικόνα 4. Αποικία του είδους <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	4
Εικόνα 5. Επταπεπτιδική χημική δομή της μικροκυστίνης-LR .....	4
Εικόνα 6. Η λίμνη Κάρλα μετά την ανακατασκευή .....	8
Εικόνα 7. Αρτίβλαστα της ομάδας Βρύση .....	17
Εικόνα 8. Αρτίβλαστα της ομάδας Κάρλα .....	17
Εικόνα 9. Φυτά των ομάδων BP και ΒΨ .....	18
Εικόνα 10. Φυτά των ομάδων KP και ΚΨ .....	19
Εικόνα 11. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα BP.....	30
Εικόνα 12. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα ΒΨ .....	31
Εικόνα 13. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα KP .....	32
Εικόνα 14. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα ΚΨ .....	33
Εικόνα 15. Περιοχές με άλατα στις ομάδες BP και ΒΨ .....	34
Εικόνα 16. Προσκολλημένα βακτήρια στην ομάδα KP .....	35
Εικόνα 17. Προσκολλημένα βακτήρια στην ομάδα ΚΨ στην πάνω επιφάνεια φύλλου .....	35
Εικόνα 18. Προσκολλημένα βακτήρια στην ομάδα ΚΨ στην κάτω επιφάνεια φύλλου .....	36
Εικόνα 19. Προσκολλημένα βακτήρια, στόματα και αλαταδένας .....	36

## Λίστα γραφημάτων

Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη μετατροπής των τιμών SPAD σε συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών a+b ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) .....	12
Γράφημα 2. Αριθμός αρτίβλαστων ανά ημέρα πειράματος .....	16
Γράφημα 3. Μέτρηση του νωπού βάρους και ξηρού βάρους φύλλων και ξηρού βάρους ρίζας (g) .....	20
Γράφημα 4. Υπόγεια προς την υπέργεια βιομάζα .....	21
Γράφημα 5. Συνολική βιομάζα (g ξηρού βάρους) .....	21
Γράφημα 6. Συνολική επιφάνεια φύλλων ( $\text{cm}^2$ ) .....	22
Γράφημα 7. Αριθμός φύλλων .....	23
Γράφημα 8. Ειδική Μάζα των Φύλλων ( $\text{g}$ ξηρού βάρους/ $\text{dm}^2$ ) .....	23
Γράφημα 9. Σχετικό Περιεχόμενο σε Νερό (%).....	25
Γράφημα 10. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ( $\text{mg GAE} / 100\text{g FW}$ ) .....	25
Γράφημα 11. Πυκνότητα στομάτων της πάνω και της κάτω επιφάνειας (αρ. στομάτων $\text{cm}^{-2}$ ) .....	26
Γράφημα 12. Συνολική πυκνότητα στομάτων (αρ. στομάτων $\text{cm}^{-2}$ ) .....	27
Γράφημα 13. Μέσο μήκος στοματικού πόρου της πάνω και της κάτω επιφάνειας ( $\mu\text{m}$ ) .....	28
Γράφημα 14. Συνολικό μέσο μήκος στοματικού πόρου ( $\mu\text{m}$ ) .....	29
Γράφημα 15. Συνολική βακτηριακή προσκόλληση (αρ. βακτηρίων $\text{cm}^{-2}$ ) .....	37
Γράφημα 16. Προσκολλημένα βακτήρια στην πάνω επιφάνεια (αρ. βακτηρίων $\text{cm}^{-2}$ ) .....	38
Γράφημα 17. Προσκολλημένα βακτήρια στην κάτω επιφάνεια (αρ. βακτηρίων $\text{cm}^{-2}$ ) .....	38



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά για τα κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια κατατάσσονται στην επικράτεια των Bacteria και περιλαμβάνουν περίπου 150 γένη εκ των οποίων τα 40 χαρακτηρίζονται τοξικά. Τα πιο σημαντικά τοξικά γένη είναι τα: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Lyngbya* και *Microcystis* (Παπαδημητρίου, 2010). Τα κυανοβακτήρια διαβιούν στον πλανήτη Γη εδώ και 3 δισεκατομμύρια χρόνια κάνοντας χρήση της ηλιακής ακτινοβολίας μέσα από τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, ενώ παράλληλα απελευθερώνουν οξυγόνο στην ατμόσφαιρα (Gutu & Kehoe 2012). Είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί και μοιάζουν με τα ευκαρυωτικά μικροφύκη αλλά απουσιάζει ο διακριτός πυρήνας (Chorus and Cavalieri, 2000).



Εικόνα 1. Απεικόνιση κυανοβακτηρίων Tolypothrix (Πηγή: algalweb.net).

Είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και μπορούν να μεταβάλουν και να δεσμεύουν το άζωτο που υπάρχει στο περιβάλλον όπου διαβιούν, είτε είναι υγρό έδαφος, ή νερό, ή συμβίωση με άλλους οργανισμούς (φυτικούς και ζωικούς, Berman-Frank *et al.*, 2003). Οι αποικίες τους μπορεί να σχηματίζουν διάφορες μορφές όπως νημάτια, σφαιρικά ή ακανόνιστα πεπλατισμένα συστήματα. Ορισμένα νηματοειδή μπορούν να διαφοροποιηθούν ως προς τύπο των κυττάρων όπως τα βλαστικά κύτταρα που λειτουργούν ως φωτοσυνθετικά και αναπτύσσονται όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές. Σε περίπτωση όπου το περιβάλλον είναι λιγότερο ευνοϊκό σχηματίζουν σπόρια τα οποία είναι πιο ανθεκτικές δομές που καλούνται ακινέτες.



Εικόνα 2. Αποικίες *Nostoc pruniform* όπως βρέθηκαν στο περιβάλλον (Rodriguez *et al.*, 2017).

Τα κυανοβακτήρια μπορούν να ρυθμίσουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αναερόβιες συνθήκες μέσα από ειδικά κύτταρα που ονομάζονται ετεροκύστες, τα οποία περιέχουν τα κατάλληλα ένζυμα (Dodds *et al.*, 1995). Αυτές μπορούν να λειτουργήσουν σε ανοξικές συνθήκες μετατρέποντας την αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ) σε νιτρώδη ( $\text{NO}_2$ ) ή νιτρικά ( $\text{NO}_3$ ) ιόντα - τα οποία απορροφούνται και από τα φυτά - και να τα μετατρέπουν σε πρωτεΐνη και νουκλεϊκά οξέα.

Τα υδρόβια κυανοβακτήρια, υπό συγκεκριμένες συνθήκες δημιουργούν ανθίσεις εμφανίζοντας μπλε-πράσινο χρωματισμό (Gutu and Kehoe, 2012). Οι συνθήκες που ευνοούν το φαινόμενο είναι οι υψηλές θερμοκρασίες και ο ευτροφισμός, αλλά και ο χαμηλός υδροδυναμισμός όπως συμβαίνει σε λιμνίσκους, σε λίμνες και σε στάσιμα νερά. Αυτού του είδους η άνθιση είναι επιβαρυντική για το υδάτινο σύστημα γιατί μπορεί να καλύψει πλήρως την υδάτινη επιφάνεια (Bryant, 2006). Στην Εικόνα 3 φαίνεται μία σημαντική άνθιση που καταγράφηκε στη λίμνη Erie του Ohio στις ΗΠΑ, η οποία δεχόταν αυξημένες εισροές φωσφόρου από τις λανθασμένες καλλιεργητικές πρακτικές και τα αστικά λύματα (Rinta-Kanto *et al.*, 2009).

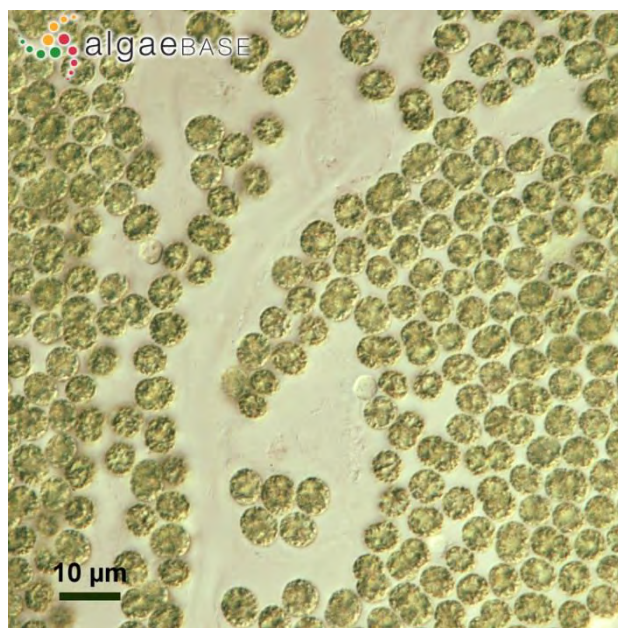


Εικόνα 3. Απεικόνιση κυανοβακτηριακής άνθισης στη λίμνη Erie, Ohio, USA, στις 29 Σεπτεμβρίου 2014 (Πηγή: NOAA.gov).

## 1.2 Γενικά για τις μικροκυστίνες

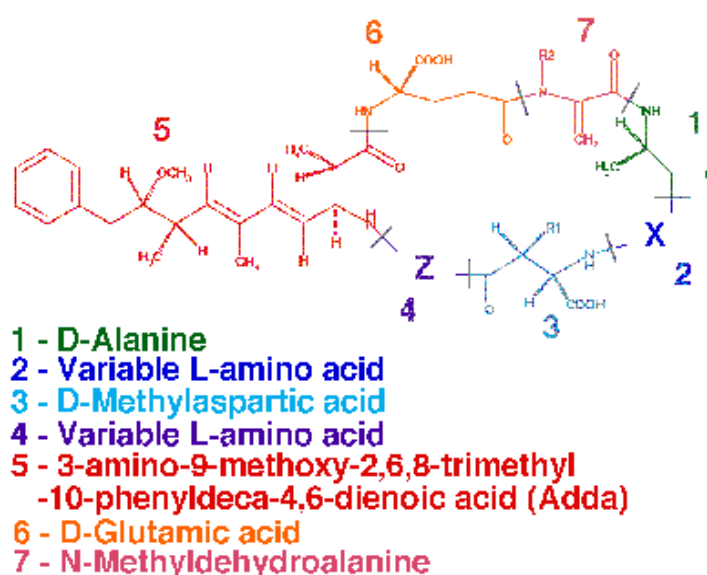
Ορισμένα κυανοβακτήρια παράγουν κυανοτοξίνες, σε ιδιαίτερα υψηλές μάλιστα συγκεντρώσεις κατά τις ανθίσεις τους, οι οποίες αποτελούν πρόβλημα για τη δημόσια υγεία εάν καταναλωθούν δια μέσου του πόσιμου νερού ή της τροφής. Τα διάφορα είδη τοξικών κυανοβακτηρίων μπορούν να παράγουν νευροτοξίνες, κυτοτοξίνες, ενδοτοξίνες και ηπατοτοξίνες (de Figueiredo *et al.*, 2004). Μία κατηγορία των ηπατοτοξινών είναι και οι μικροκυστίνες (MCs) που παράγονται κυρίως από το είδος *Microcystis aeruginosa* ή από άλλα είδη του γένους *Microcystis* αλλά και τα *Planktothrix*, *Anabaena*, *Oscillatoria* και *Nostoc*. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω από 50 είδη μικροκυστινών και η πιο κοινή είναι η μικροκυστίνη-LR (microcystin-LR) (Whitton and Potts, 2007).





Εικόνα 4. Αποικία του είδους *Microcystis aeruginosa* (Πηγή: algaebase.org).

Η χημική τους δομή είναι κυκλικά επταπεπίδια (Εικόνα 5). Οι μικροκυστίνες είναι χημικά σταθερές σε ευρύ φάσμα θερμοκρασίας και pH ως αποτέλεσμα της κυκλικής δομής τους. Λόγω της κυκλικής τους φύσης δεν μπορούν να διασπαστούν με πρότυπες πρωτεάσες όπως η πεψίνη, η τρυψίνη, η κολλαγονάση και η χυμοθρυψίνη (Smith *et al.*, 2010).



Εικόνα 5. Επταπεπτιδική χημική δομή της μικροκυστίνης-LR (Πηγή: cyanosite.bio.purdue.edu).



Οι μικροκυστίνες είναι ιδιαίτερα τοξικές και προκαλούν προβλήματα υγείας όταν φτάνουν στο άνθρωπο μέσω επιβαρυνμένης τροφής ή νερού (Aboal and Puig, 2005), μάλιστα ανήκουν στις 80 πιο τοξικές ουσίες (Crush *et al.*, 2008). Οι μικροκυστίνες δεσμεύονται ομοιοπολικά και αναστέλλουν πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1 και 2A και μπορούν έτσι να προκαλέσουν προβλήματα στο ήπαρ ή καταστροφή αυτού μέσα από την διόγκωσή του, λόγω συσσώρευσης μεγάλων ποσοτήτων αίματος (Crush *et al.*, 2008). Μετά την κατάποση μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω του συστήματος μεταφοράς των χολικών οξέων όπου και συσσωρεύονται, αν και μερικές παραμένουν στην ροή του αίματος και μπορεί να μολύνουν τους ιστούς. Άλλα συμπτώματα που προκαλούνται στα θηλαστικά είναι αδυναμία, ωχρότητα, γαστρεντερίτιδα ακόμη και θάνατος από αιμορραγία σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών μετά την έκθεση (de Figueiredo *et al.*, 2004). Επιπλέον, η εισπνοή ή η επαφή των ρινικών βλεννωδών μεμβρανών μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο (Παπαδημητρίου, 2010).

Η τιμή LD<sub>50</sub>, που αναφέρεται στη συγκέντρωση μιας ουσίας που είναι ικανή να προκαλέσει το θάνατο του μισού αριθμού ατόμων από τον συνολικό αριθμό των οργανισμών που εκτίθενται στην τοξική ουσία, για την μικροκυστίνη-LR κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 36-122μg/kg σωματικού βάρους μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση και από 43 έως 200μg/kg σωματικού βάρους μετά από εισπνοή της τοξίνης για τους ζωικούς οργανισμούς (WHO 1998).

Οι μικροκυστίνες μπορούν να βιοσυσσωρεύονται στους υδρόβιους οργανισμούς όπως στο ζωοπλαγκτόν, στα μαλάκια, στα καρκινοειδή και στους ιχθύς. Αποτέλεσμα της βιοσυσσώρευσης των μικροκυστινών στους οργανισμούς είναι η μεταφορά τους μέσω της τροφικής αλυσίδας που μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της θνησιμότητας διαφόρων ειδών (από Papadimitriou *et al.*, 2013).

### 1.3 Μικροκυστίνες και φυτά

Οι μικροκυστίνες υπάρχουν συνήθως μέσα στα κυανοβακτήρια και εισέρχονται στο περιβάλλον - νερό μετά από την κυτταρική λύση (Watanabe *et al.*, 1992). Όταν το νερό που περιέχει κυανοβακτήρια χρησιμοποιείται ως αρδευτικό, ποσότητες MCs προσλαμβάνονται από τα φυτά και ανιχνεύονται στους ιστούς τους (Bibo *et al.*, 2008, McElhiney *et al.*, 2001). Οι περισσότερες από τις έρευνες για τις επιπτώσεις των μικροκυστινών στα φυτά υποδηλώνουν ότι η έκθεση σε μικροκυστίνες μέσω μολυσμένου αρδευτικού νερού με τοξικά κυανοβακτήρια αποτελεί απειλή για την ποιότητα και την απόδοση των καλλιεργούμενων

φυτών στο περιβάλλον. Οι MCs είναι γνωστό ότι επιδρούν σε μία σειρά φυτικών διεργασιών (φύτρωση σπέρματος, ανάπτυξη ρίζας, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, φωτοσύνθεση) και έχουν, επομένως, σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και την απόδοση των καλλιεργούμενων φυτών (Corbel *et al.*, 2014). Αρχικά οι Kos *et al.* (1995) ανέφεραν ότι οι μικροκυστίνες-LR είναι ικανές να εμποδίσουν την ανάπτυξη σπόρων σιναπιού. Αργότερα οι Hamvas *et al.* (2002) περιέγραψαν τις ανασταλτικές επιδράσεις των MC-LR στον σχηματισμό και την ανάπτυξη της πλευρικής ρίζας και την περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες στο φυτό σινάπι και απέδειξαν ότι οι MC-LR προκαλούν νέκρωση στα φυτά, ιδιαίτερα στις κοτυληδόνες. Κατά την έκθεση του υδρόβιου φυτού *Ceratophyllum demersum* στην κυανοβακτηριακή τοξίνη MC-LR σε συγκέντρωση 5,0 mg / L, παρατηρήθηκε αύξηση της μικροσωμικής και κυτοσολικής S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, υποδεικνύοντας την έναρξη του σχηματισμού συζυγούς γλουταθειόνης-τοξίνης (Bibo *et al.*, 2008). Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι μία από τις άμεσες συνέπειες της παρουσίας MCs στο φυτικό ιστό, έτσι το φυτό αντιδρά με ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού του οπλοστασίου (Chen *et al.*, 2010; Peuthert *et al.*, 2010; Pichardo *et al.*, 2011). Οι Chen *et al.* (2004) ανέφεραν αυξήσεις της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης (Peroxidase - POD) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase - SOD), δύο από τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που δρουν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS), σε φυτά που εκτίθενται σε μικροκυστίνες. Επίσης, έχουν καταγραφεί φυτοτοξικές επιδράσεις των μικροκυστινών στην ανάπτυξη της πατάτας (*Solanum tuberosum* L.) του φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) (McElhiney *et al.*, 2001) και αρκετών άλλων σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών (Sagrane *et al.*, 2008).

Η άρδευση με ψεκασμό με νερό που περιέχει πληθυσμούς κυανοβακτηρίων μπορεί να οδηγήσει στην έκθεση των εναέριων τμημάτων των φυτών σε κυανοβακτήρια και στις τοξίνες τους (Codd *et al.*, 1997). Μία έρευνα των Abe *et al.* (1996) έδειξε πως επηρεάστηκε η φωτοσύνθεση στο είδος *Phaseolus vulgaris* L. έπειτα από ψεκασμό των φυτών με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες. Παρατήρησαν αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A, ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης μειώθηκε πάνω από το 50% σε διάστημα 8 ωρών εμφάνισης των φύλλων σε διάλυμα μικροκυστινών-LR 0,01mol m<sup>-3</sup>. Συμπέρασμα αυτού είναι ότι σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις MC-LR προκαλούν βλάβη στα φωτοσυνθετικά συστήματα του *P. vulgaris*. Γι' αυτό τον λόγο πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στις πρακτικές άρδευσης με ψεκασμό για φυτά καλλιέργειας που περιλαμβάνουν τη χρήση νερού που περιέχει ανθίσεις κυανοβακτηρίων και μικροκυστίνες.

#### 1.4 Επιτρεπτά όρια μικροκυστινών

Η έκθεση του ανθρώπου σε μικροκυστίνες μπορεί να σχετίζεται, εκτός από το πόσιμο νερό, και με κατανάλωση επιβαρυνμένων λαχανικών/καρπών. Ο κίνδυνος αναγνωρίστηκε εδώ και μία εικοσαετία και οδήγησε στον καθορισμό κατευθυντήριων γραμμών και ορίων για αυτές τις τοξίνες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization - WHO). Το προτεινόμενο επίπεδο ασφαλούς κατανάλωσης κατά τη διάρκεια της ζωής ήταν  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  για τις MC-LR (από Fitzgerald, 2001) και βασίστηκε σε μελέτες σε ζώα με MC-LR με χορήγηση από το στόμα σε χοίρους και ποντίκια (Fitzgerald, 2001). Πολλές χώρες (όπως η Βραζιλία, η Νέα Ζηλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο) υιοθέτησαν αυτή την τιμή ως κατευθυντήρια γραμμή για το πόσιμο νερό, αλλά ο Καναδάς πρότεινε την τιμή των  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  και η Αυστραλία προτείνει τιμές που κυμαίνονται από  $1,3$  έως  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (USEPA, 2001). Στον Καναδά, προτάθηκε επίσης μια τιμή  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  για βραχυχρόνια έκθεση (Fitzgerald, 2001).

Αποδεκτό ανώτατο όριο ανθρώπινης κατανάλωσης μικροκυστινών σε ημερήσια βάση (Tolerable Daily Intake, TDI) ορίστηκε από τον WHO (1998) η τιμή level 0,04 μικρογραμμάρια ανά κιλό σωματικού βάρους.

#### 1.5 Λίμνη Κάρλα

Η λίμνη Κάρλα ή Βοιβήδα βρίσκεται στην κεντρική Ελλάδα στην περιοχή της Θεσσαλίας στα όρια των νομών Λαρίσης και Μαγνησίας. Κατά την αρχή της δεκαετίας του '60 ξεκίνησε η αποξήρανσή της με σκοπό την κάλυψη αναγκών για αγροτικές εκτάσεις. Αρχικά η λίμνη κάλυπτε μια περιοχή περίπου ίση με  $180\text{km}^2$  και η αποστράγγιση της λίμνης πραγματοποιήθηκε μέσω μιας σήραγγας οδηγώντας το νερό στον Παγασητικό Κόλπο (από Kormas *et al.*, 2015; Oikonomou *et al.*, 2012). Η επαφή της λίμνης με τον Πηνειό ποταμό είχε ως αποτέλεσμα την τροφοδότηση αυτής για την αποφυγή πλημμυρικών φαινομένων. Πριν την αποξήρανση της λίμνης υπάρχουν πηγές που αναφέρουν ότι η λίμνη έχει χαρακτηριστεί ως ευτροφική αλλά με υψηλή σταθερότητα (Ananiadis, 1956). Στη δεκαετία του '90 αποφασίστηκε η επαναπλήρωση της λίμνης με εισερχόμενο νερό από τον κοντινό ποταμό Πηνειό (από Oikonomou *et al.*, 2012). Η πλήρωση ξεκίνησε τον Σεπτέμβριο του 2009 μετά την κατασκευή ενός περιφερειακού φράγματος που καλύπτει  $38\text{km}^2$  και περίμετρο  $30,55\text{km}$ . Η λίμνη δέχεται επίσης επιφανειακή απορροή από τη γύρω περιοχή - η οποία είναι κυρίως

γεωργική - και εισροές πολυετών ροών που εκρέουν από τη γύρω ορεινή γη. Η λίμνη δεν έχει φυσική εκροή (Sidiropoulos *et al.*, 2012).



Εικόνα 6. Η λίμνη Κάρλα μετά την ανακατασκευή (Πηγή: Google Earth).

Η ανακατασκευή της λίμνης αποτελεί ένα έργο υψηλής σημασίας καθώς είναι η πρώτη λίμνη που ανακατασκευάζεται στην Ευρώπη αποτελώντας το μεγαλύτερο ευρωπαϊκό περιβαλλοντικό πρόγραμμα με περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη (Gialis and Laspidou, 2014). Εντούτοις, αυτή τη στιγμή χαρακτηρίζεται από μικρό βάθος, με στόχο μέγιστου βάθους νερού 4,5m (Nikouli *et al.*, 2013). Επίσης, η Κάρλα εκτίθεται σε σημειακές και διάχυτες πηγές ρύπανσης που οδηγούν ήδη σε προοδευτικό ευτροφισμό με συχνή εμφάνιση βακτηριακών ανθίσεων (Chamoglou *et al.*, 2014; Gkelis *et al.*, 2017). Αν και περιλαμβάνεται στο δίκτυο ελληνικής και διεθνούς προστασίας (Περιοχή NATURA 2000 και τοποθεσία Ramsar αντίστοιχα), λόγω της σημασίας του ως ζωτικής σημασίας υδρόβιου οικοσυστήματος όσον αφορά τη βιοποικιλότητα, έχει ήδη επηρεαστεί αρνητικά από τη γεωργική και βιομηχανική ρύπανση από τη γύρω περιοχή (από Papadimitriou *et al.*, 2016). Η λίμνη λειτουργεί ως αποδέκτης λιπασμάτων και γεωργικών αποβλήτων, λόγω της κακής ποιότητας και οικολογικής κατάστασης του νερού από τον Πηνειό ποταμό, σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες και την ηλιακή ακτινοβολία καθ' όλη τη διάρκεια του έτους αυξάνεται ο ρυθμός εξάτμισης (Οίκοπομου *et al.*, 2012) οδηγώντας μεγάλο αριθμό ψαριών στο θάνατο. Επίσης, οι μικροκυστίνες που έχουν ήδη ανιχνευθεί στην Κάρλα, κυμαίνονται από 1,5 έως 33  $\mu\text{g/L}$  (Papadimitriou *et al.*, 2013). Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1) εμφανίζονται στοιχεία

από μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στη λίμνη κατά τα έτη 2010-2015 κυρίως κατά τη θερινή περίοδο.

Πίνακας 1. Μετρήσεις νερού και χαρακτηριστικά λίμνης κατά τα έτη 2010-2015 (Papadimitriou *et al.*, 2013, Mellios *et al.*, 2015).

Συγκεντρώσεις	Τιμές
Φώσφορος	0,02 έως 0,5 mg L <sup>-1</sup>
Νιτρικό άλας	0,1 έως 2 mg L <sup>-1</sup>
Χλωροφύλλη-α	63 έως 1200 µg L <sup>-1</sup>
Διαλυμένο οξυγόνο %	88.2
pH	9.04

Σύμφωνα με το σχέδιο κατανομής και διαχείρισης του νερού της Περιφέρειας Θεσσαλίας, η εγκατάσταση ενός αντλιοστασίου και ενός δικτύου άρδευσης που θα προμηθεύουν τους αγρότες νερό από την Κάρλα βρίσκεται στα άμεσα σχέδια, ενώ η χρήση δεξαμενών για πόσιμο νερό είναι ο τελικός στόχος αυτού του έργου ανασυγκρότησης της λίμνης. Ωστόσο, οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία που σχετίζονται με υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών στην Κάρλα είναι σημαντικοί (Papadimitriou *et al.*, 2016).

## 1.6 Σκοπός της εργασίας

Η λίμνη Κάρλα χαρακτηρίζεται από ευτροφικές συνθήκες και αυξημένη συγκέντρωση τοξικών μικροκυστινών που φαίνεται ότι μειώνουν την ανάπτυξη των φυτών. Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη των επιπτώσεων που επιφέρει στο σπανάκι (*Spinacia oleracea* L.) η χρήση αρδευτικού νερού με υψηλή συγκέντρωση κυανοτοξινών, όπως είναι το νερό από τη λίμνη Κάρλα. Επιπλέον, η παρατήρηση μορφολογικών, ανατομικών και φυσιολογικών διαφορών στο σπανάκι έπειτα από τον ψεκασμό των φυτών ως τρόπος άρδευσης καθώς η άρδευση με ψεκασμό θεωρείται η πιο κοινή μέθοδος στις καλλιέργειες που λαμβάνουν χώρα στην περιοχή γύρω από τη λίμνη.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αναπτυξιακή περίοδος

Τα φυτά σπανακιού αναπτύχθηκαν σε χώμα που συλλέχθηκε από το αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο στις 11/11/2016 και κοσκινίστηκε από κόσκινο με διάμετρο πόρων 4mm. Η σύσταση του εδάφους φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2). Στις 21/11/2016 έγινε η φύτευση των σπόρων σπανακιού *Spinacia oleracea*, ποικιλίας Virofly «Wonderseed» με χώμα και περλίτη (2:1). Αρχικά, τα φυτά διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ανάλογα με το νερό ποτίσματος. Η ομάδα Β λάμβανε νερό βρύσης και η ομάδα Κ λάμβανε νερό από τη λίμνη Κάρλα, που συλλέχθηκε από τη λίμνη κατά την φθινοπωρινή περίοδο του ίδιου έτους. Στις 14/12/2016 έγινε μεταφύτευση των φυτών σε γλάστρες χωρητικότητας 2L με χώμα και περλίτη (1:1). Κάθε ομάδα περιελάμβανε 30 φυτά, 60 συνολικά, στα οποία χορηγούνταν 100ml νερού ανάλογα με κάθε μεταχείριση και η χορήγηση γινόταν 2 έως 3 φορές την εβδομάδα. Στις 27/12/2016 έγινε τυχαίος διαχωρισμός των δειγμάτων από κάθε ομάδα για την μετ' έπειτα μεταχείρισή τους ως προς την μέθοδο ποτίσματος ως εξής:

BP: φυτά που λάμβαναν νερό βρύσης στη ρίζα του φυτού

BΨ: φυτά που λάμβαναν νερό βρύσης με ψεκασμό

KP: φυτά που λάμβαναν νερό από τη λίμνη Κάρλα στη ρίζα του φυτού

KΨ: φυτά που λάμβαναν νερό από τη λίμνη Κάρλα με ψεκασμό

Κάθε ομάδα περιλάμβανε 15 φυτά στα οποία η ποσότητα χορήγησης του νερού ήταν 100ml ανά φυτό και το πότισμα των φυτών διεξάγονταν 2 φορές την εβδομάδα. Κάθε 15 μέρες πραγματοποιούνταν αλλαγή της θέσης των φυτών (rotation) για την αποφυγή των επιδράσεων της μικροθέσης. Επιπλέον, κάθε 15 μέρες χορηγούνταν 100ml υγρού λιπάσματος με νερό βρύσης και με νερό από τη λίμνη Κάρλα αντίστοιχα σε κάθε φυτό. Η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε στα θερμοκήπια του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά και σύσταση του εδάφους από το αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βελεστίνο.

Χαρακτηριστικά και σύσταση εδάφους	Τιμές
Κοκκομετρική σύσταση	Πηλώδες (L)
pH (1:2 wt/vol σε νερό)	7,78
Ανθρακικά άλατα (%) Bernard method	10,25
Οργανική ουσία (%) Walkey-Black Method	2,886
I.A.K. (meq/100 g εδάφους)	15,83
Φώσφορος κατά Olsen (mg/Kg)	23,29
Κάλιο εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	302
Νάτριο εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	66
Άζωτο (%) κατά Kjeldahl	0,126
Μαγνήσιο εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	465
Ασβέστιο εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	8390
Σίδηρος εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	5,56
Ψευδάργυρος εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	1,198
Μαγγάνιο εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	15,38
Χαλκός εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	2,306
Ηλεκτρική αγωγιμότητα (μS/cm)	257

Κατά την πειραματική διαδικασία μετρήθηκε το Σχετικό Περιεχόμενο σε Νερό (Relative Water Content - RWC) σε 3 ώρες, 1 και 2 ημέρες μετά το πότισμα. Η διαδικασία έγινε ως εξής: αφαιρέθηκαν δίσκοι από τα φύλλα και αμέσως μετρήθηκε το νωπό τους βάρος και έπειτα από 24ωρη ενυδάτωση το κορεσμένο τους βάρος. Ακολούθησε 24ωρη ξήρανση στους 80 °C, και καταγράφηκε το ξηρό βάρος των δίσκων. Ο δείκτης RWC υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση:

$$RWC = ((NB-\Xi B)/(KB-\Xi B))*100$$

όπου

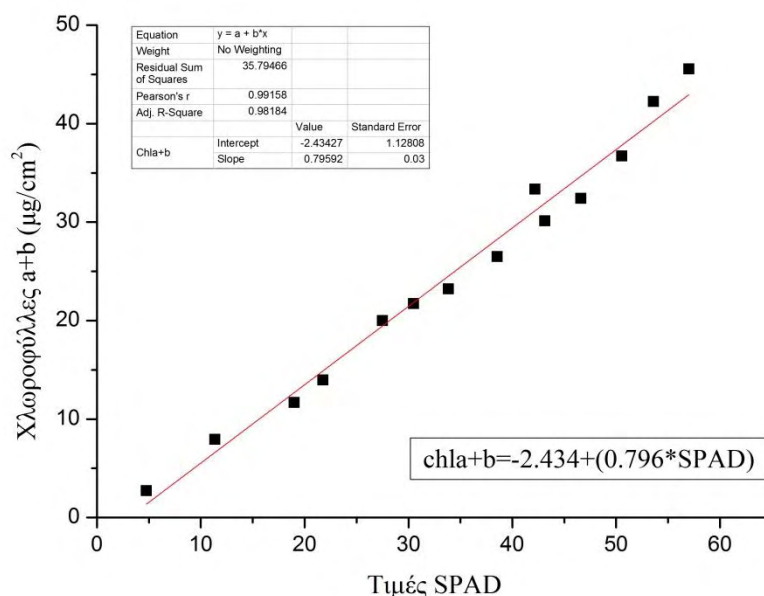
NB, το νωπό βάρος του δείγματος

ΞB, το ξηρό βάρος του δείγματος

KB, το κορεσμένο βάρος του δείγματος

## 2.2 Τελική συλλογή

Κατά την τελική συλλογή (2-3-2017) μετρήθηκε η χλωροφύλλη με όργανο SPAD (Konica Minolta) όπου λήφθηκαν 4 τιμές στον κάθετο άξονα του φυτού από το νεαρότερο προς το γηραιότερο. Οι τιμές αυτές μεταφράστηκαν σε τιμές χλωροφύλλης a+b με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης που φαίνεται στο ακόλουθο γράφημα.



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη μετατροπής των τιμών SPAD σε συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών a+b ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Η πρότυπη κατασκευάστηκε ως εξής: επιλέχθηκαν τυχαία δείγματα φύλλων, καταγράφηκε η τιμή SPAD αυτών, ενώ στη συνέχεια εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο που αναλύεται στο 2.3 υποκεφάλαιο.

Στη συνέχεια της τελικής συλλογής καταγράφηκε το νωπό βάρος των φύλλων και η συνολική επιφάνεια τους, με τη βοήθεια scanner και προγράμματος επεξεργασίας εικόνας "Image Pro". Δείγματα φύλλων ελήφθησαν για αποθήκευση στους  $-20^\circ\text{C}$  για τις μετρήσεις βιοχημικών παραμέτρων που ακολούθησαν. Επίσης, μέρη φύλλων τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% και στο ψυγείο (στους  $4^\circ\text{C}$ ) προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Οι ρίζες καθαρίστηκαν με νερό και ακολούθησε 48ωρη ξήρανση στους  $80^\circ\text{C}$  του υπέργειου και υπόγειου μέρους του φυτού, μετά την οποία μετρήθηκε το ξηρό βάρος των φύλλων και της ρίζας.



## 2.3 Μέτρηση συγκέντρωσης φωτοσυνθετικών χρωστικών

Η συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών μετρήθηκε σε φύλλα που είχαν αποθηκευτεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γουδί πορσελάνης μαζί με μικρή ποσότητα (0,5g) καθαρής άμμου και ανθρακικού ασβεστίου ( $\text{CaCO}_3$  0,1g). Τα φύλλα εκχυλίστηκαν με 5ml ακετόνης 80%, τα οποία προστέθηκαν σταδιακά. Τα εκχυλίσματα μεταγγίστηκαν σε σωλήνες φυγόκεντρου και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 2500g (4000 στροφές ανά λεπτό). Τα διαυγή πράσινα υπερκείμενα μεταγγίστηκαν σε ογκομετρικούς σωλήνες και καταγράφηκαν οι όγκοι τους. Τα υπερκείμενα φωτομετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 470, 646, 663 και 720nm και καταγράφηκαν οι απορροφήσεις αυτών αφού πρώτα αραιώθηκαν 3 φορές. Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις σε χλωροφύλλη a, χλωροφύλλη b και σε συνολικά καροτενοειδή σε  $\mu\text{g/ml}$  διαλύματος με βάση τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$C_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$$

$$C_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 3.27C_a - 104C_b)/229$$

Όπου

$C_a$ , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a,  $\mu\text{g/ml}$  διαλύματος

$C_b$ , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b,  $\mu\text{g/ml}$  διαλύματος

$C_{x+c}$ , η συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες και καροτένια),  $\mu\text{g/ml}$  διαλύματος

Για την εξαγωγή των τελικών συγκεντρώσεων έγιναν οι απαραίτητες αναγωγές στον τελικό όγκο της εκχύλισης, την αραιώση και την επιφάνεια φύλλου που χρησιμοποιήθηκε.

## 2.4 Μέτρηση προλίνης

Η προλίνη μετρήθηκε σε παγωμένο ιστό (10 δείγματα/μεταχείριση) με τη μέθοδο της όξινης νινυδρίνης σύμφωνα με τη μέθοδο των Bates *et al.* 1973 τροποποιημένη από τους Khan *et al.* 2000. Αρχικά για κάθε δείγμα, ζυγίστηκαν 250mg νωπού δείγματος σπανακιού, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγόκεντρου και προστέθηκαν 10 ml υδατικού διαλύματος 3% σουλφοσαλκυλικού και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 30min. Στη συνέχεια, έγινε διήθηση μέσω χάρτινου φίλτρου σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Έπειτα, σε σωλήνες φυγόκεντρου προστέθηκαν 2ml εκχυλίσματος, 2ml της όξινης νινυδρίνης και 2ml οξικού οξέος και επώαστηκαν ξανά σε υδατόλουτρο στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 1h. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε πάγο και έπειτα σε μεγαλύτερους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου

προστέθηκαν 4ml τουλουόλιου και έγινε ανάδευση για 15sec. Μετά τον διαχωρισμό των φάσεων, δηλαδή τον διαχωρισμό του χρωμοφόρου που περιείχε τουλουόλιο από την υδατική φάση του διαλύματος, μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 520nm με τυφλό τουλουόλιο.

## **2.5 Μέτρηση ολικών φαινολικών**

Η μέτρηση των ολικών φαινολικών πραγματοποιήθηκε σε ξηρό ιστό με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole 1994). Αρχικά ζυγίστηκαν 300mg κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε αυτούς προστέθηκαν 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50% και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 40°C για 1h υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε διήθηση με χάρτινα φίλτρα με βοήθεια χωνιού. Σε μεγαλύτερου μεγέθους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 3,95ml απιονισμένου νερού, 0,05ml (50λ) του υπερκείμενου και 0,25ml (250λ) αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Έπειτα από ανάδευση, προστέθηκαν μετά από 1-8min 0,75ml (750λ) διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2h με συχνά vortex. Σε 1-8min μετρήθηκε η απορρόφηση στα 760nm. Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρής ουσίας (GAE, gallic acid equivalents).

## **2.6 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης**

Η παρατήρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών και βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στις 20 και 26/6/2017 με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM) εφόσον είχαν αφυδατωθεί και επιμεταλλωθεί. Κατά την διαδικασία αυτή αρχικά λήφθηκαν 2 δείγματα από κάθε φύλλο, 3 φύλλα ανά μεταχείριση, συνολικά 24, με φελλοτρυπητήρα No 6 ( $0,640\text{cm}^2$ ) για την παρατήρηση τόσο της επάνω όσο και της κάτω επιφάνειας. Έπειτα τα δείγματα αφυδατώθηκαν σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθυλικής αλκοόλης και απεσταγμένου νερού σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολούθησε η μέθοδος των διαδοχικών αφυδατώσεων όπου τα δείγματα εμβαπτιζόνταν στα διαλύματα 30, 50, 60, 70 και 80% για 10 λεπτά, 95% για 10 λεπτά με δύο επαναλήψεις (20 λεπτά συνολικά) και 100% για 10 λεπτά με τρεις επαναλήψεις (30 λεπτά συνολικά). Έπειτα

τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία και αποθηκεύτηκαν προφυλαγμένα από τη σκόνη μέχρι την φυσική ξήρανση (air drying) αυτών για 24 ώρες περίπου. Μετά τη ξήρανση, τα δείγματα επικολλήθηκαν σε μεταλλικές βάσεις (stubs) με τη βοήθεια αγωγίμης κολλητικής ταινίας διπλής όψευς. Εν συνεχεία, επιμεταλλώθηκαν με χρυσό σε συσκευή επιμετάλλωσης BAL-TEC 004 με τη βοήθεια αερίου αργού (Ar) για 170 δευτερόλεπτα στα 43 mA. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Cambridge Stereo Scan 240 και λήφθηκαν φωτογραφίες (105x έως 919x) με τις οποίες εκτιμήθηκε η πυκνότητα των στομάτων και το μέγεθος του στοματικού πόρου της πάνω και της κάτω επιφάνειας με πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ImageJ.

## **2.7 Στατιστική ανάλυση**

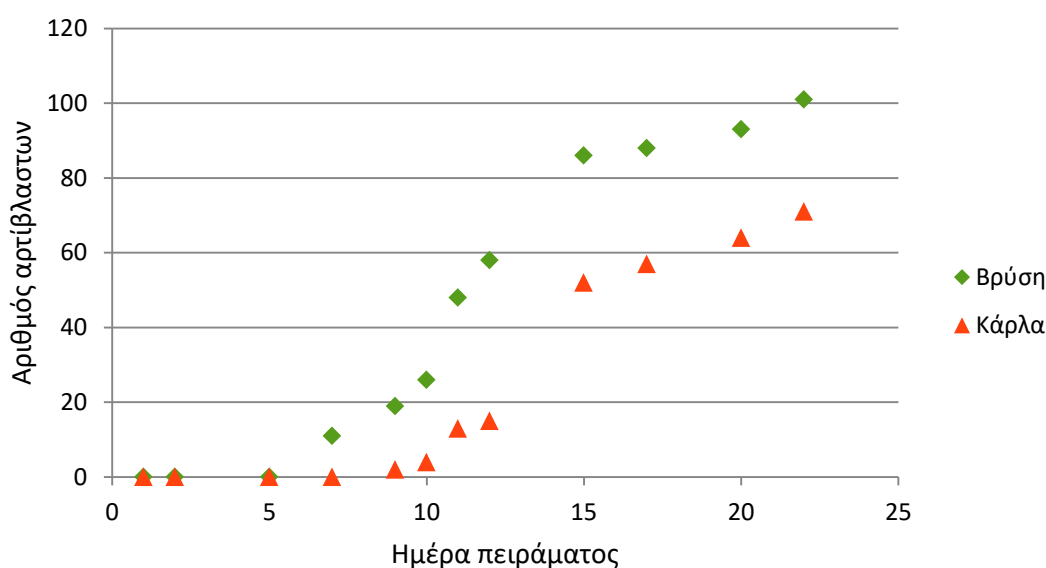
Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με Two-way ANOVA ως προς την επίδραση των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, δηλαδή α) του είδους νερού (Βρύσης και Κάρλας) και β) του συστήματος ποτίσματος (ριζοπότισμα και ψεκασμός) στις διάφορες αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους των φυτών. Στις περιπτώσεις των παραμέτρων α) αριθμός φύλλων και β) μήκος στοματικού πόρου πάνω επιφάνειας έγιναν οι εξής μετατροπές των δεδομένων: τετραγωνική ρίζα για το (α) και λογαριθμική για το (β) (SQRT and LOG transformations). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του IBM SPSS Statistics v.24.0 (IBM corp.).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μορφολογικά – αναπτυξιακά χαρακτηριστικά

Έπειτα από επτά ημέρες μετά τη σπορά εμφανίστηκαν τα πρώτα αρτίβλαστα στην ομάδα που χορηγούνταν νερό βρύσης (ομάδα Β), ενώ στην ομάδα που χορηγούνταν νερό από την λίμνη Κάρλα (ομάδα Κ) η φύτευση των σπερμάτων καθυστέρησε δύο ημέρες, δηλαδή τα αρτίβλαστα εμφανίστηκαν την ένατη ημέρα του πειράματος. Η καταγραφή της φύτευσης πραγματοποιήθηκε έως και την 22<sup>η</sup> μέρα του πειράματος, πριν δηλαδή από τη μεταφύτευση των φυτών. Το ποσοστό των σπερμάτων που φύτευσαν στην ομάδα Β ήταν 92%, ενώ στην ομάδα Κ 70%.

Στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 2) φαίνεται ο αριθμός των αρτίβλαστων όπως καταμετρήθηκε και για τις δύο ομάδες. Παρατηρήθηκε ότι στην ομάδα Β τα αρτίβλαστα ήταν περισσότερα συγκριτικά με την ομάδα Κ, ενώ στις ακόλουθες εικόνες (Εικόνες 7 και 8) φαίνονται οι διαφορές ως προς το μέγεθος τους την 22<sup>η</sup> μέρα.



Γράφημα 2. Αριθμός αρτίβλαστων ανά ημέρα πειράματος για τα φυτά της βρύσης και της Κάρλας.





Εικόνα 7. Αρτίβλαστα της ομάδας Βρύση την 22<sup>η</sup> μέρα του πειράματος.



Εικόνα 8. Αρτίβλαστα της ομάδας Κάρλα την 22<sup>η</sup> μέρα του πειράματος.



Καθ' όλη τη διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου παρατηρήθηκε ότι τα φυτά της ομάδας Β εμφάνισαν μεγαλύτερη αύξηση συγκριτικά με τα φυτά της ομάδας Κ. Το πρώτο ζεύγος αληθινών φύλλων εμφανίστηκε αρχικά στην ομάδα Β την 20<sup>η</sup> μέρα του πειράματος και έπειτα στην ομάδα Κ όπως συνέβη και με τα δεύτερα ζεύγη φύλλων σπανακιού την 34<sup>η</sup> μέρα του πειράματος.

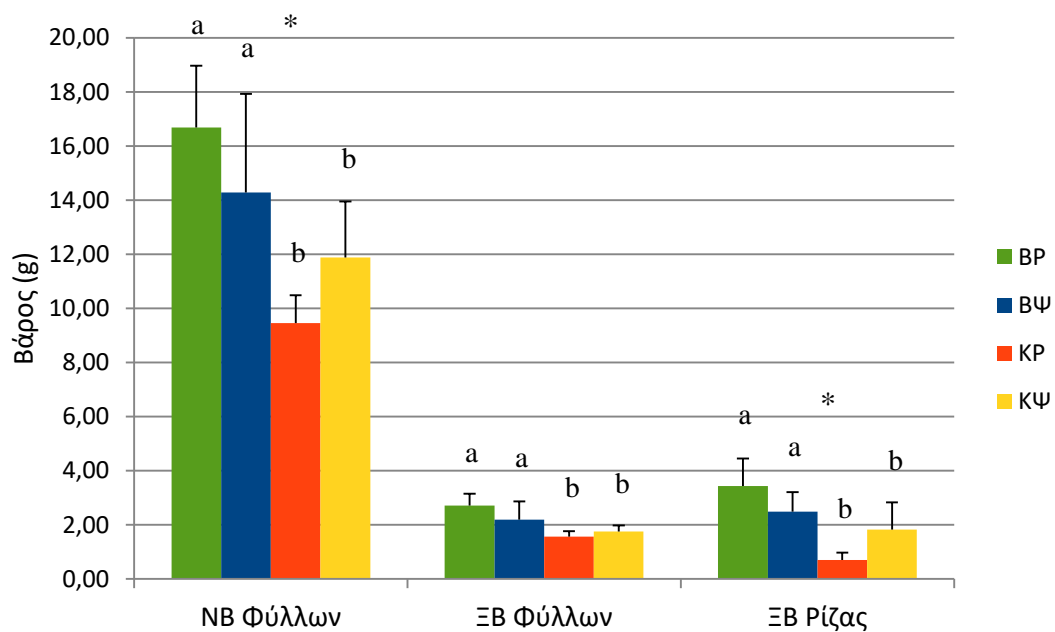


Εικόνα 9. Φυτά των ομάδων BP (αριστερά) και BΨ (δεξιά) την 82<sup>η</sup> μέρα του πειράματος.



Εικόνα 10. Φυτά των ομάδων KP (αριστερά) και KΨ (δεξιά) την 82η μέρα του πειράματος.

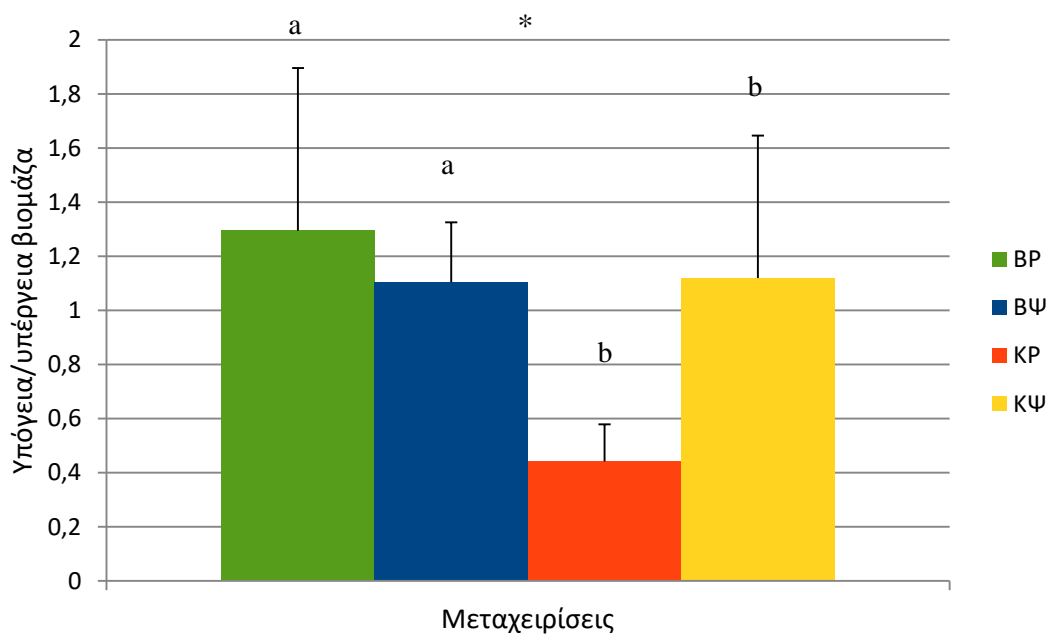
Κατά την τελική συλλογή μετρήθηκε το νωπό βάρος των φύλλων (NB φύλλων), το ξηρό βάρος αυτών (ΞΒ φύλλων) καθώς και το ξηρό βάρος της ρίζας (ΞΒ ρίζας) (Γράφημα 3). Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε αλληλεπίδραση των παραγόντων νερού και μεθόδου ποτίσματος για το νωπό βάρος των φύλλων και το ξηρό βάρος της ρίζας. Επίσης, η ομάδα με το μεγαλύτερο νωπό βάρος φύλλων ήταν η BP σε σχέση με την ομάδα KP γεγονός που δείχνει ότι το είδος του νερού επηρέασε σημαντικά το νωπό βάρος του υπέργειου μέρους. Όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ξηρού βάρους φύλλων στις ομάδες όπου χορηγήθηκε νερό από τη λίμνη Κάρλα.



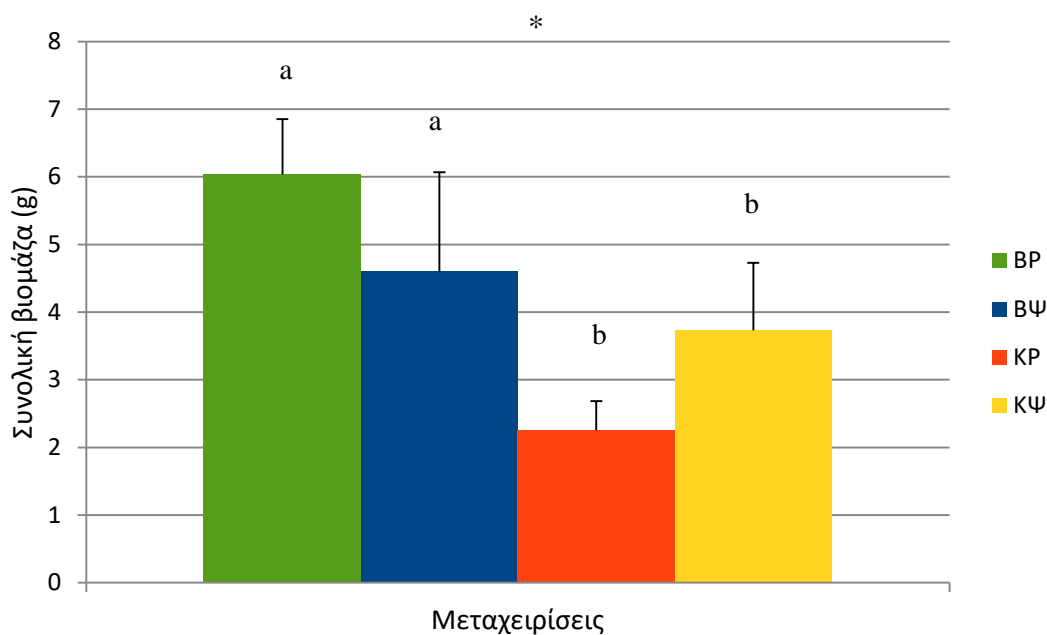
Γράφημα 3. Μέτρηση του νωπού βάρους φύλλων (αριστερά), ξηρού βάρους φύλλων (κέντρο) και ξηρού βάρους ρίζας (δεξιά) των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση για  $p < 0,05$ .

Τα αποτελέσματα του λόγου υπόγειας προς υπέργεια βιομάζα ξηρά βάρη αλλά και της συνολικής βιομάζας του φυτού φαίνονται στα Γραφήματα 4 και 5. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι και στα δύο μεγέθη υπήρξε αλληλεπίδραση των παραγόντων είδους νερού και μεθόδου ποτίσματος ενώ και το είδος του νερού τα επηρέασε σημαντικά. Σε ότι αφορά το είδος νερού τα φυτά που αρδεύτηκαν με νερό βρύσης εμφάνισαν μεγαλύτερο λόγο υπόγειας προς υπέργεια βιομάζα αλλά και συνολική βιομάζα (υπόγειο και υπέργειο μέρος) από αυτά που αρδεύτηκαν με νερό από την Κάρλα.



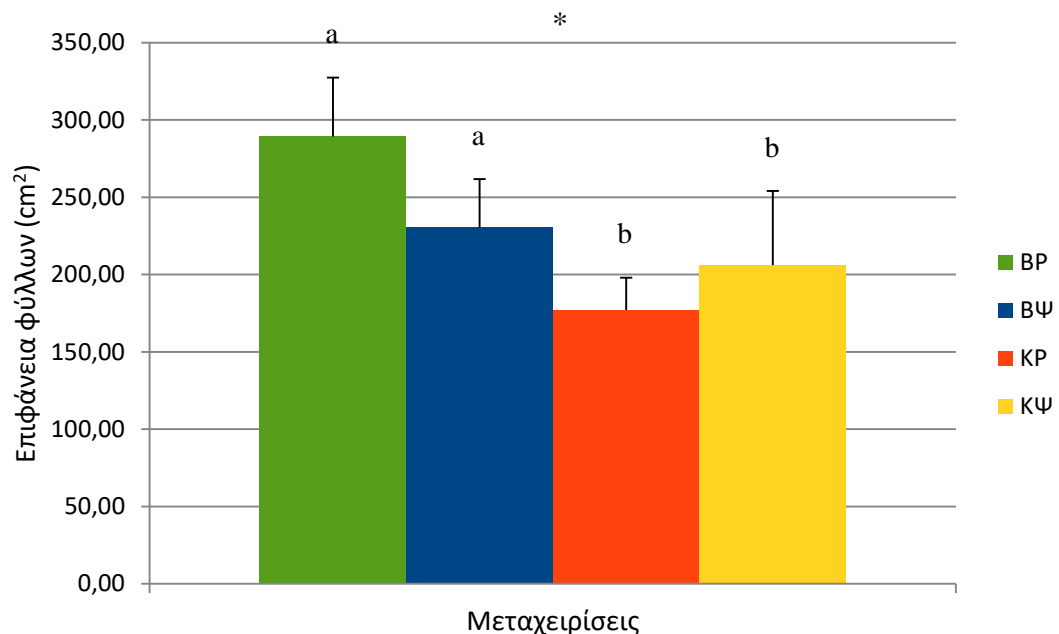


Γράφημα 4. Μέτρηση της υπόγειας προς την υπέργεια βιομάζα των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (M.O.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (είδος νερού και σύστημα ποτίσματος) για  $p < 0,05$ .

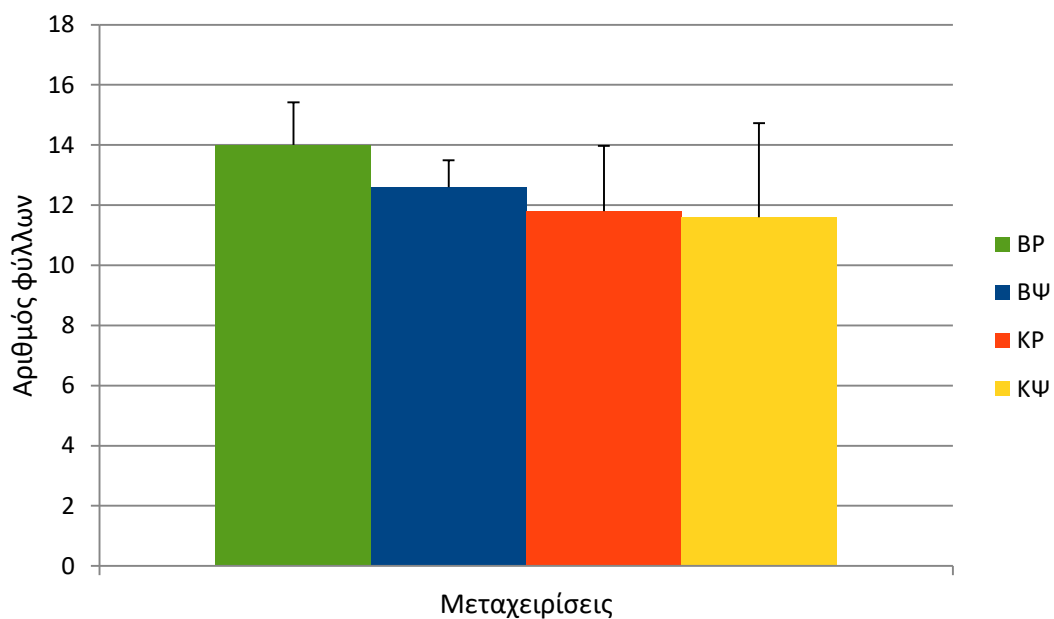


Γράφημα 5. Μέτρηση της συνολικής βιομάζας του υπόγειου και υπέργειου μέρους σε g ξηρού βάρους των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (M.O.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (είδος νερού και σύστημα ποτίσματος) για  $p < 0,05$ .

Επίσης, κατά την τελική συλλογή μετρήθηκε η επιφάνεια των φύλλων του υπέργειου μέρους καθώς και ο αριθμός των φύλλων ανά φυτό για όλες τις ομάδες. Τα στατιστικά αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε αλληλεπίδραση των παραγόντων νερού και μεθόδου ποτίσματος. Επιπλέον, το νερό από τη λίμνη Κάρλα προκάλεσε σημαντική μείωση της συνολικής επιφάνειας των φύλλων σε σχέση με το μάρτυρα.

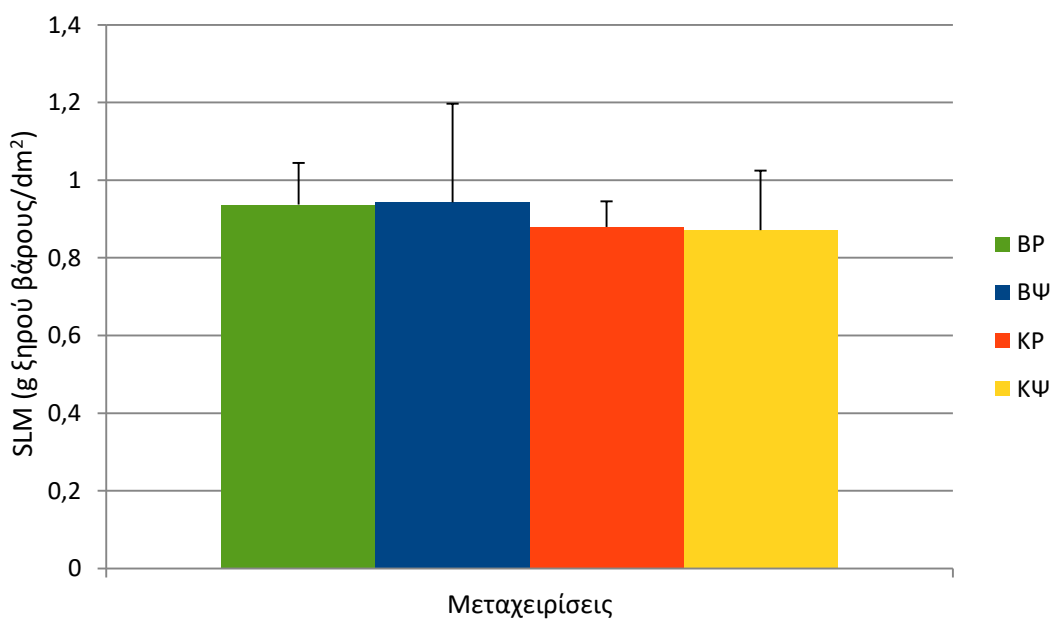


Γράφημα 6. Η συνολική επιφάνεια των φύλλων των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (είδος νερού και σύστημα ποτίσματος) για  $p<0,05$ .



Γράφημα 7. Ο αριθμός φύλλων των φυτών των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (M.O.±SD).

Η Ειδική Μάζα Φύλλων (Specific Leaf Mass – SLM) δεν εμφάνισε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων (Γράφημα 8).



Γράφημα 8. Η Ειδική Μάζα των Φύλλων - SLM των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (M.O.±SD).

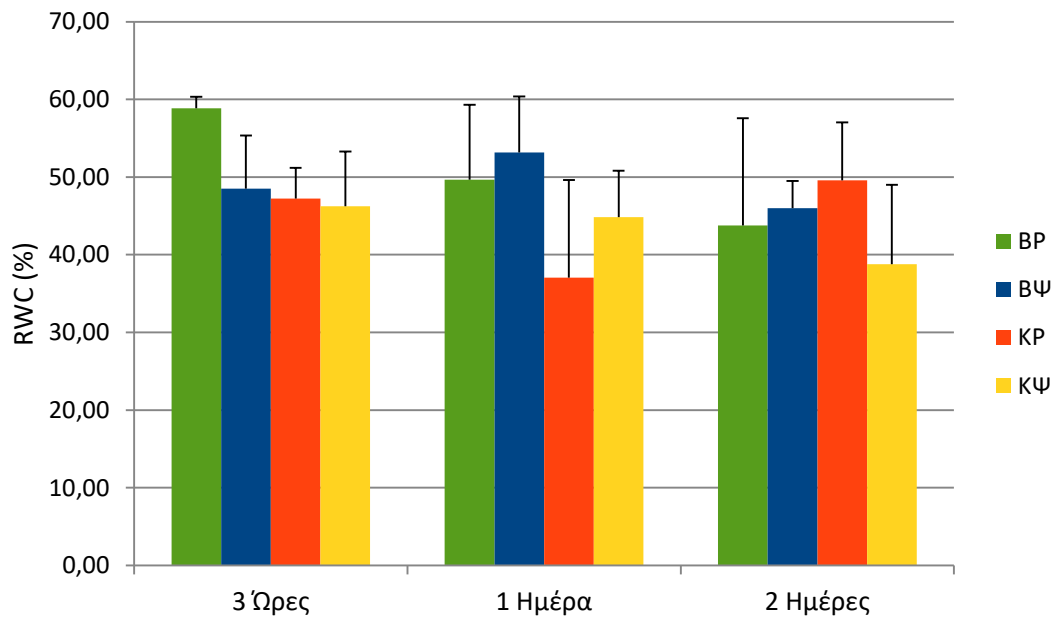
### 3.2 Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Σε ότι αφορά τις συγκεντρώσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b καταγράφηκαν στην ομάδα ΚΡ (Πίνακας 3). Φαίνεται ότι το νερό από την Κάρλα προκάλεσε σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a και του λόγου χλωροφύλλης προς καροτενοειδή και στα φυτά του ψεκασμού αλλά και του ριζοποτίσματος.

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις φωτοσυνθετικών χρωστικών και των μεταξύ τους αναλογιών στα φυτά των διαφόρων μεταχειρίσεων, κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού.

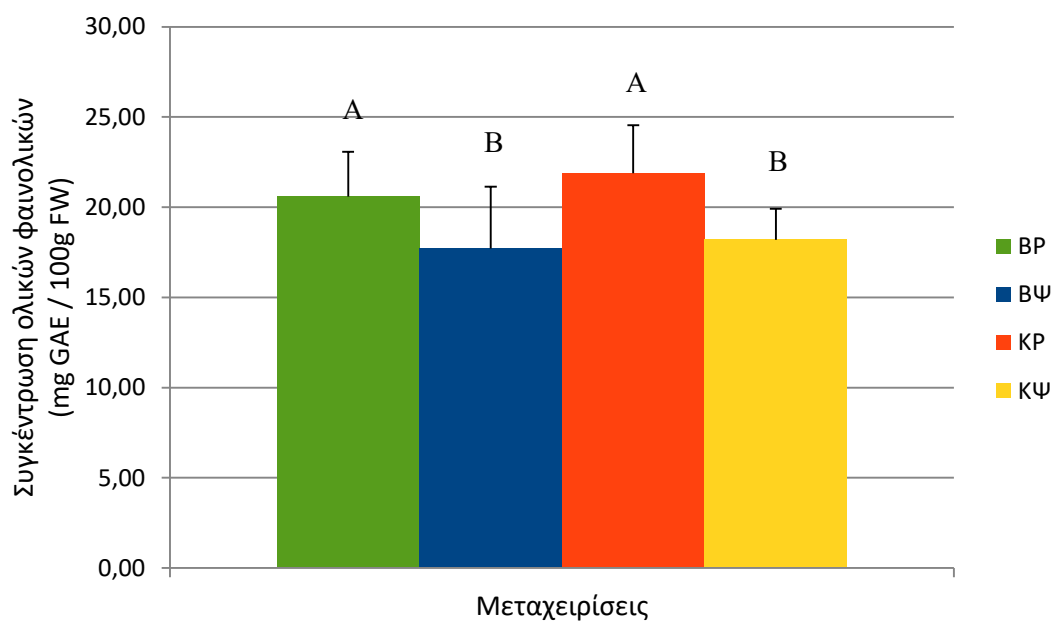
	BP	ΒΨ	ΚΡ	ΚΨ
<b>chl a</b>	37,87 ± 14,05 <sup>a</sup>	37,74 ± 4,23 <sup>a</sup>	48,91 ± 13,69 <sup>b</sup>	47,17 ± 7,95 <sup>b</sup>
<b>chl b</b>	11,56 ± 4,12	10,94 ± 0,94	13,96 ± 3,77	13,82 ± 2,34
<b>car</b>	11,65 ± 3,80	11,39 ± 0,73	13,53 ± 2,95	13,26 ± 2,03
<b>a+b</b>	49,43 ± 18,14	48,69 ± 5,12	62,87 ± 17,43	60,99 ± 10,25
<b>a/b</b>	3,27 ± 0,17	3,44 ± 0,15	3,50 ± 0,18	3,42 ± 0,12
<b>chl/car</b>	4,22 ± 0,38 <sup>a</sup>	4,28 ± 0,42 <sup>a</sup>	4,60 ± 0,30 <sup>b</sup>	4,60 ± 0,24 <sup>b</sup>

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 9) φαίνονται οι τιμές του Σχετικού Περιεχομένου σε Νερό (Relative Water Content – RWC) σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά το πότισμα, όπου δεν φαίνεται να ακολουθείται κάποιο πρότυπο, αλλά ούτε και σημαντική πτώση δύο μέρες μετά το πότισμα. Η εκτίμηση της συσσώρευσης προλίνης στα φύλλα είχε μηδενικά αποτελέσματα. Φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος ωσμολύτης δεν περιλαμβάνεται στο αμυντικό - ως προς την καταπόνηση- οπλοστάσιο του σπανακιού.



Γράφημα 9. Μέτρηση του Σχετικού Περιεχόμενου σε Νερό (Relative Water Content – RWC) για 3 ώρες μετά το πότισμα (αριστερά), 1 ημέρα μετά το πότισμα (κέντρο) και 2 ημέρες μετά το πότισμα (δεξιά) των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD).

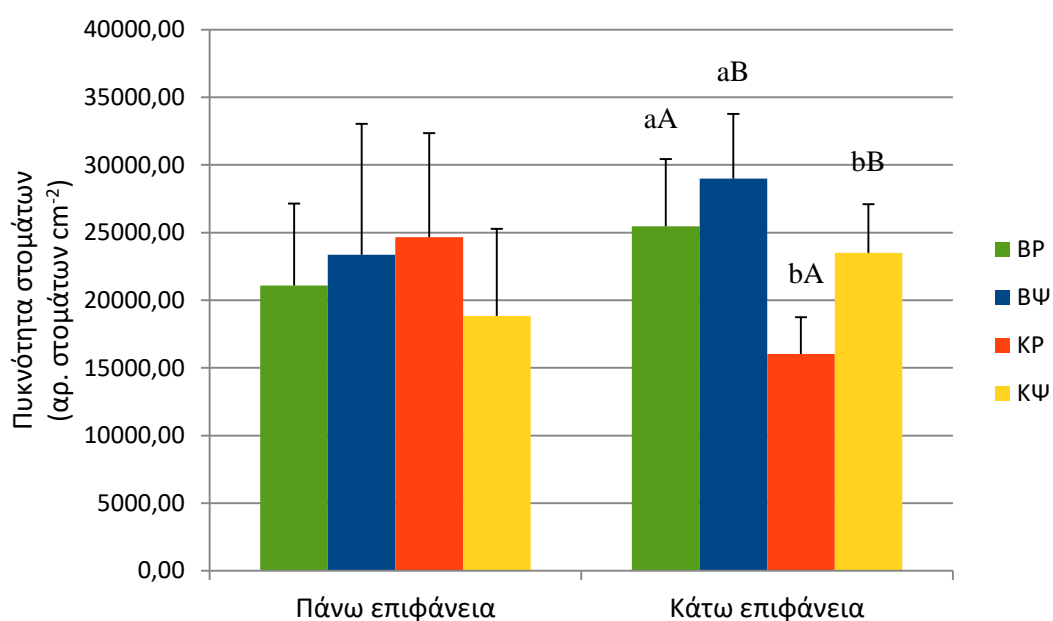
Τα αποτελέσματα από την μέτρηση των ολικών φαινολικών απεικονίζονται στο Γράφημα 10. Οι ομάδες του ψεκασμού (BΨ και ΚΨ) εμφάνισαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά και η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η μέθοδος ποτίσματος επηρέασε σημαντικά τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών.



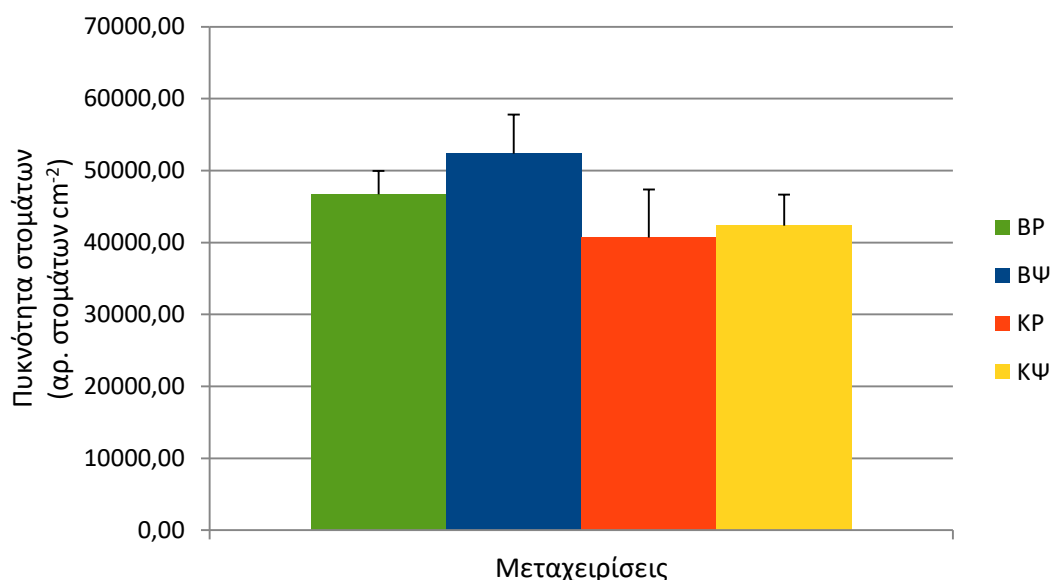
Γράφημα 10. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε ισοδύναμο γαλλικού οξέος (mg GAE / 100g FW) των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα Α και Β υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω των μεθόδων ποτίσματος.

### 3.3 Ανατομικά χαρακτηριστικά

Με βάση τις φωτογραφίες που ελήφθησαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης εκτιμήθηκε η πυκνότητα των στομάτων ανά  $\text{cm}^2$  στην πάνω και την κάτω επιφάνεια των φύλλων για όλες τις ομάδες (Γραφήματα 11 και 12). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 11 παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός στομάτων στην κάτω επιφάνεια, αυτό ανατρέπεται στα φυτά της ομάδας ΚΡ. Επιπλέον, υπήρξε σημαντική επίδραση της μεθόδου ποτίσματος για την πυκνότητα των στομάτων της κάτω επιφάνειας και παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που ψεκάστηκαν εμφάνισαν σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των στομάτων σε σχέση με αυτά που ποτίστηκαν στη ρίζα. Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων (είδος νερού και μέθοδος ποτίσματος). Εντούτοις, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην πυκνότητα στομάτων της πάνω επιφάνειας, αλλά και ανά μονάδα επιφάνειας του φύλλου συνολικά για τα φυτά των διαφόρων μεταχειρίσεων.

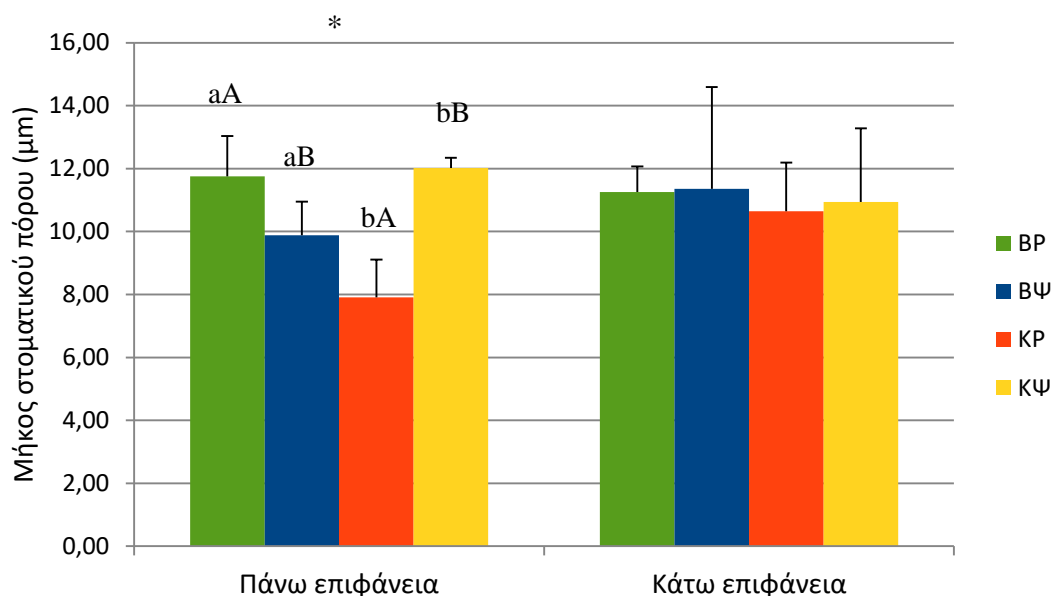


Γράφημα 11. Μέτρηση της πυκνότητας των στομάτων της πάνω και της κάτω επιφάνειας ανά  $\text{cm}^2$  των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Τα A και B υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω των μεθόδων ποτίσματος, αλλά δεν υπήρξε αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων.



Γράφημα 12. Μέτρηση της συνολικής πυκνότητας στομάτων ανά cm<sup>2</sup> φύλλου (σύνολο πάνω κάτω επιφάνειας) των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD).

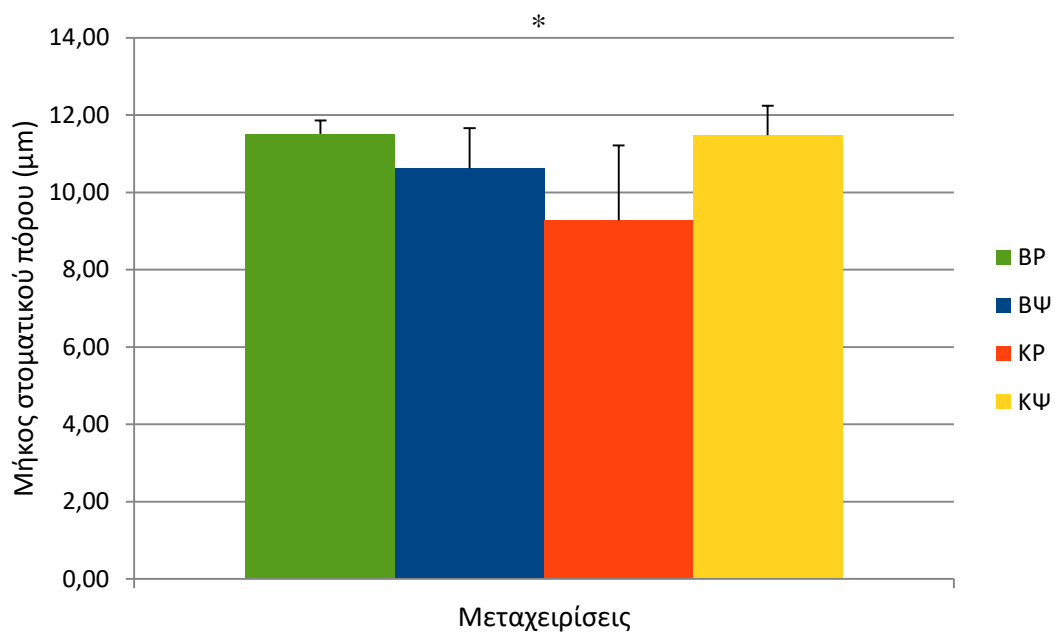
Σε ότι αφορά το μήκος του στοματικού πόρου, σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν για τα στόματα της πάνω επιφάνειας των φύλλων. Εκεί, από την στατιστική ανάλυση προέκυψε αλληλεπίδραση των παραγόντων νερού και μεθόδου ποτίσματος όπως φαίνεται και στο Γράφημα 13. Τα φυτά KP φέρουν τα μικρότερα στόματα σε σχέση τόσο με τους αντίστοιχους μάρτυρες BP, όσο και με τα KΨ. Η στατιστική εικόνα είναι ότι εκτός από την αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων του πειράματος, σημαντική επίδραση είχε και ο καθένας χωριστά. Στην κάτω επιφάνεια δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.



Γράφημα 13. Μέσο μήκος του στοματικού πόρου της πάνω και της κάτω επιφάνειας των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Τα A και B υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω των μεθόδων ποτίσματος, αλλά δεν υπήρξε αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (είδος νερού και σύστημα ποτίσματος) για  $p < 0,05$ .

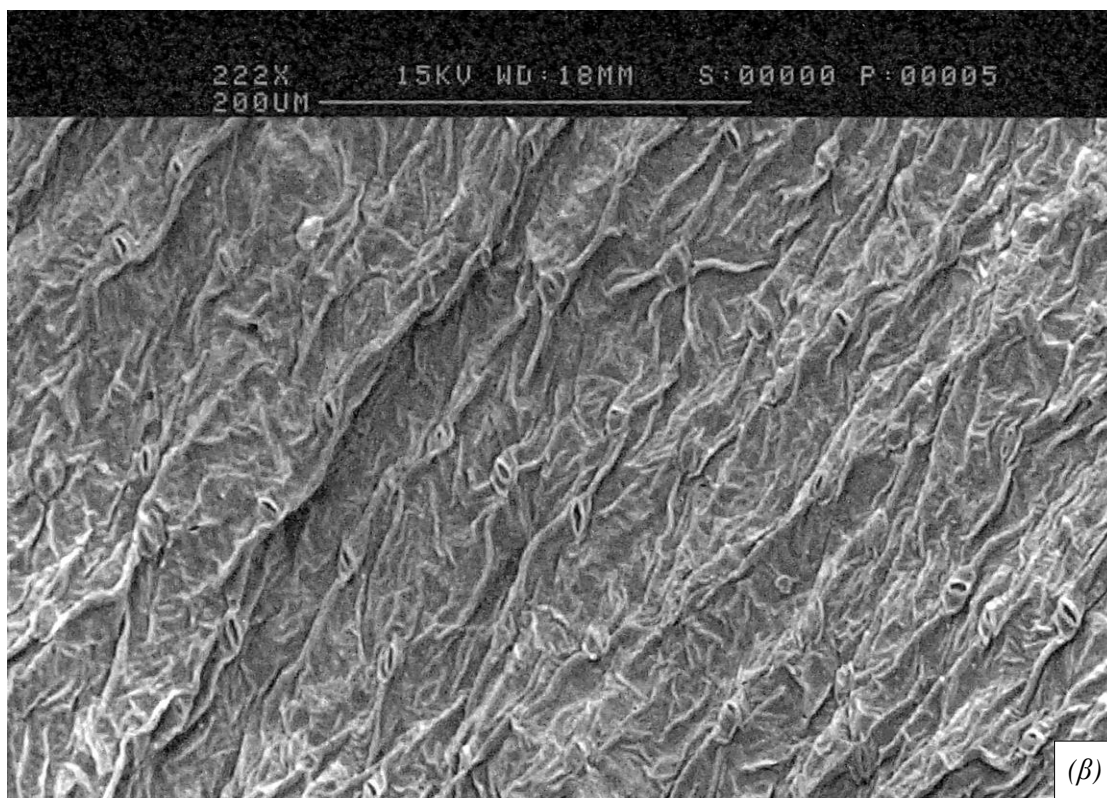
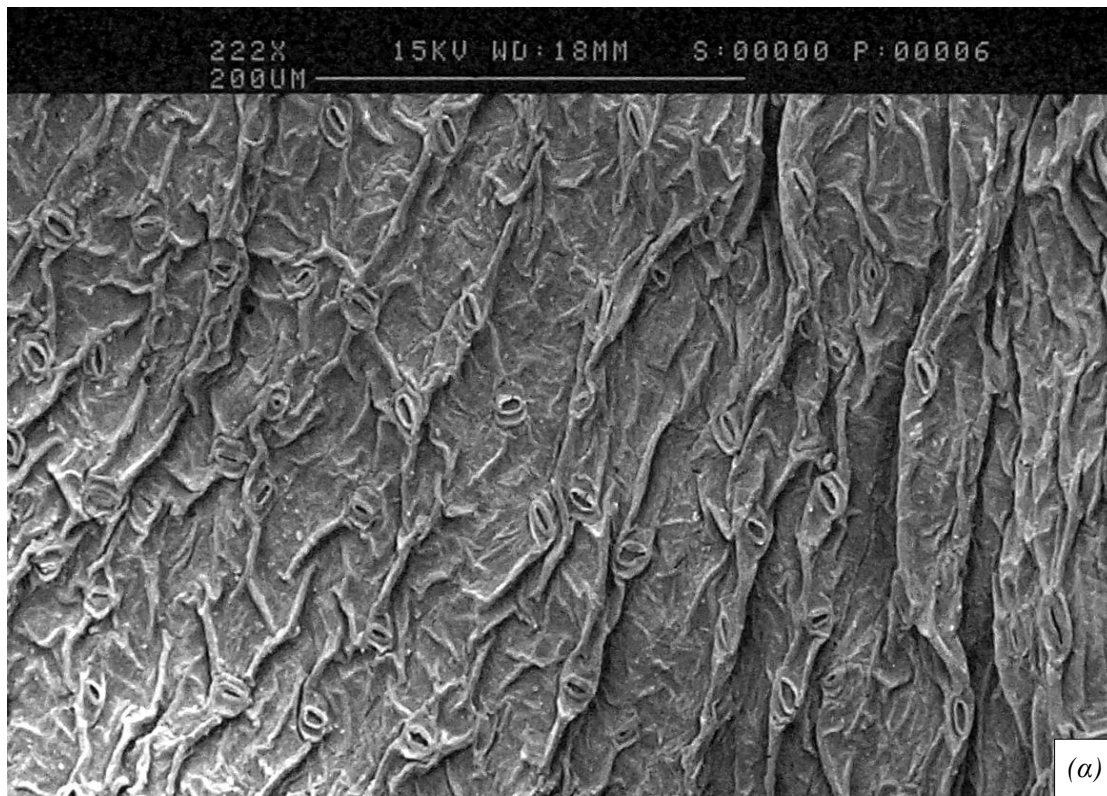
Στο Γράφημα 14 παρουσιάζεται το μέσο μήκος του στοματικού πόρου για τα φυτά των διαφόρων μεταχειρίσεων, ως μέσος όρος των τιμών της άνω και της κάτω επιφάνειας του φύλλου. Παρότι οι σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν για την άνω επιφάνεια αποτυπώνονται ως πρότυπο και εδώ, δεν καταγράφονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ομάδων, αλλά καταγράφηκε αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων.



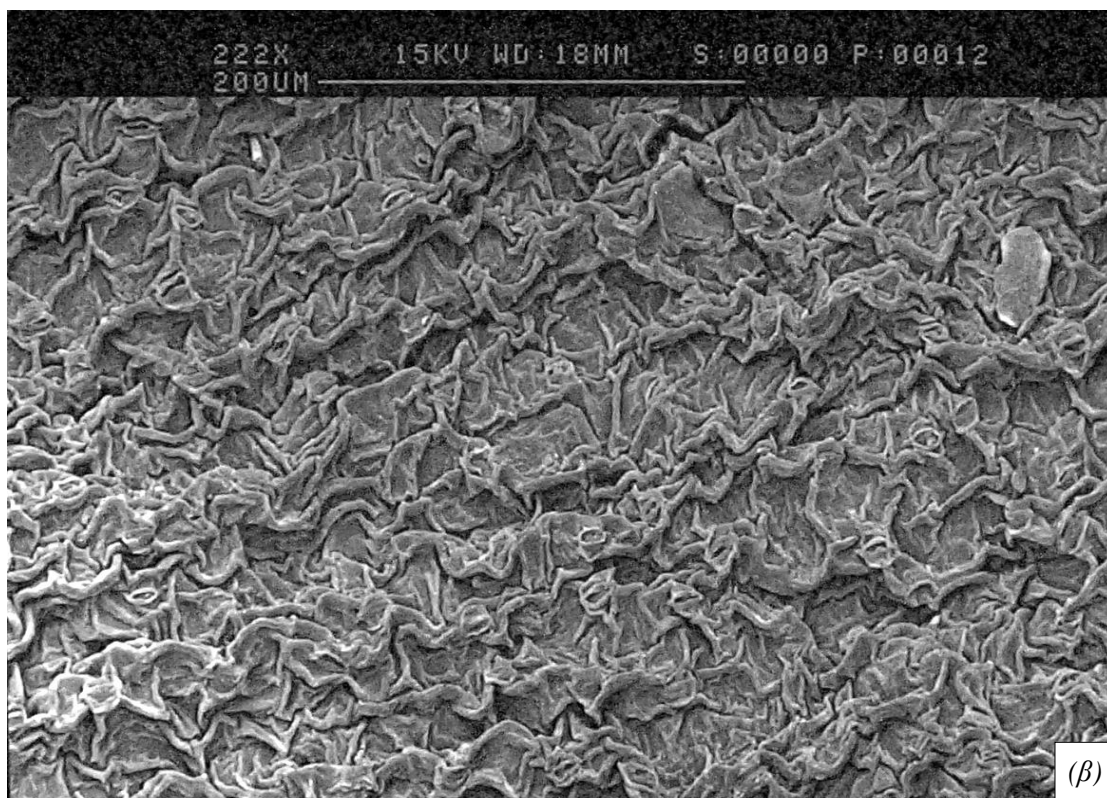
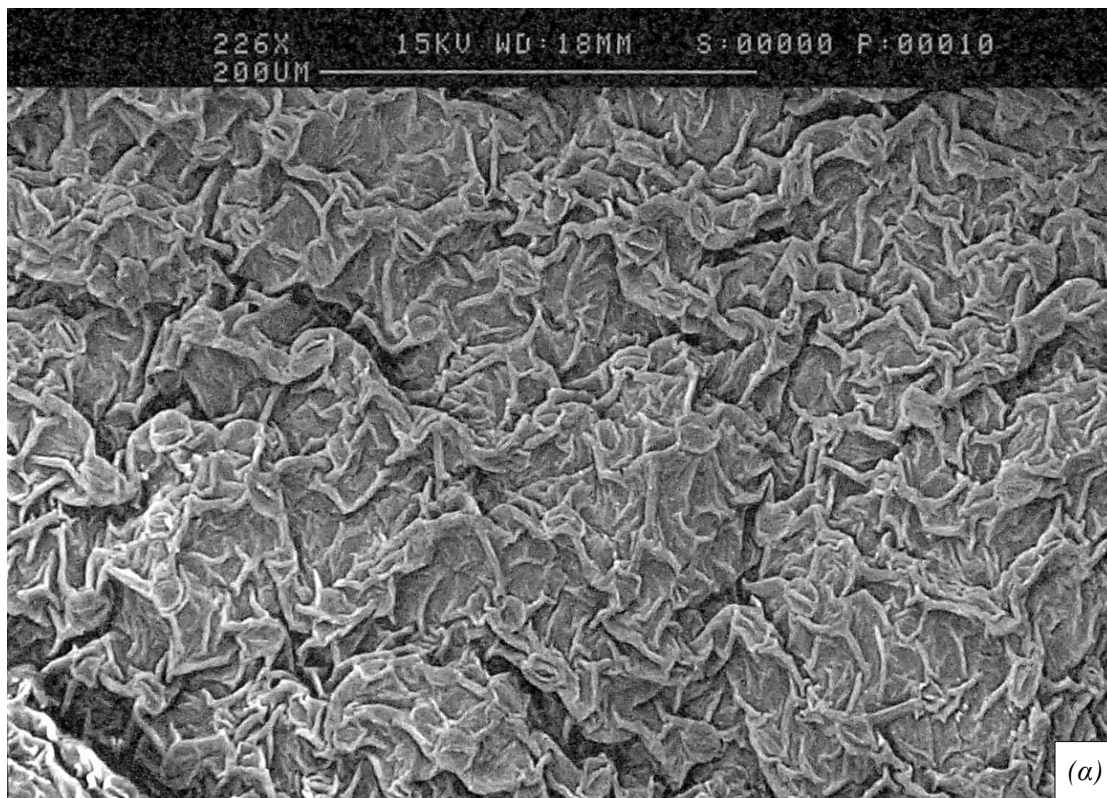


Γράφημα 14. Μέσο μήκος του στοματικού πόρου της πάνω και της κάτω επιφάνειας των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση για  $p<0,05$ .

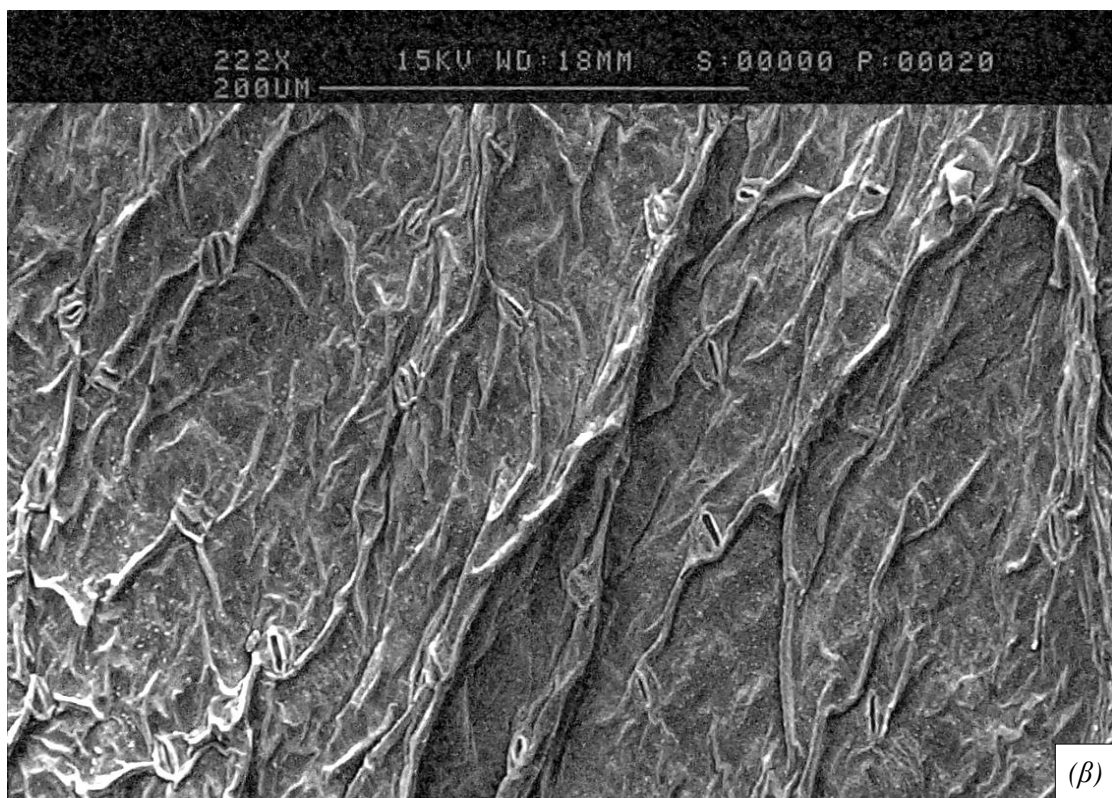
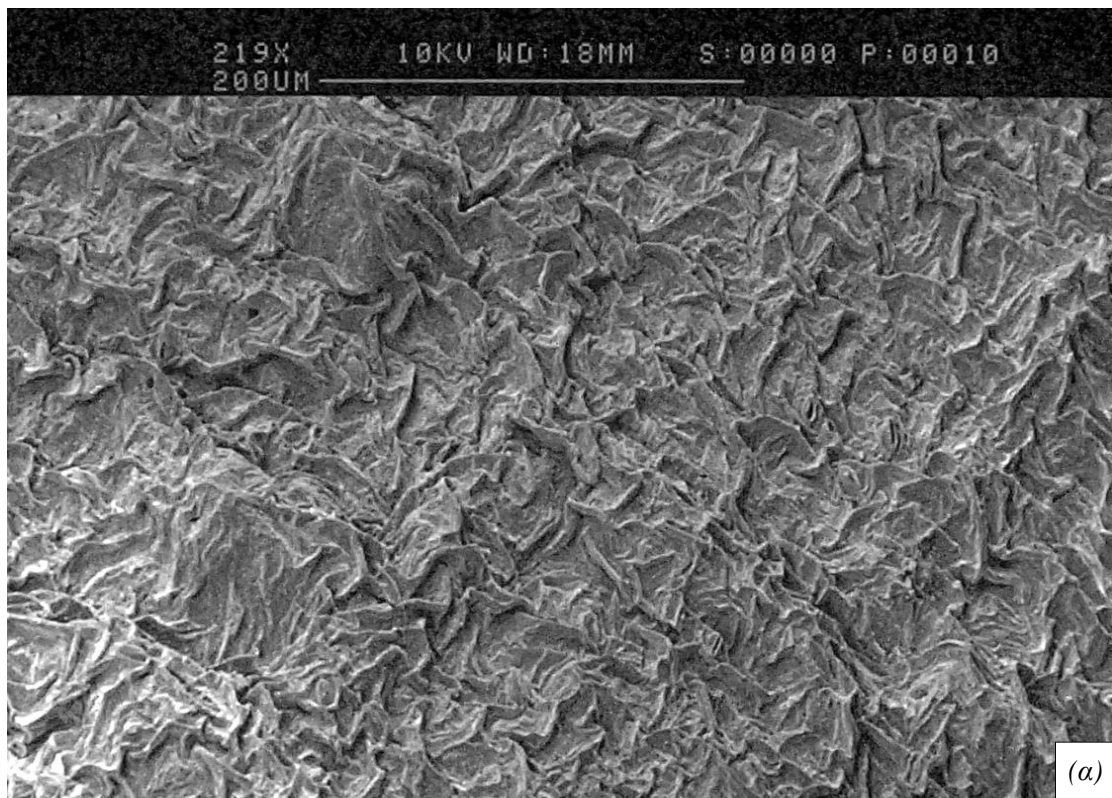
Στις ακόλουθες εικόνες φαίνονται οι πάνω και οι κάτω επιφάνειες όπως παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Είναι εμφανή τα στόματα αλλά και το διαφορετικό ανάγλυφο σε κάθε επιφάνεια. Επίσης παρατηρήθηκαν περιοχές με άλατα και αλαταδένες.



Εικόνα 11. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα BP (α) Επάνω επιφάνεια και (β) κάτω επιφάνεια, κλίμακα μπάρας 200μm.

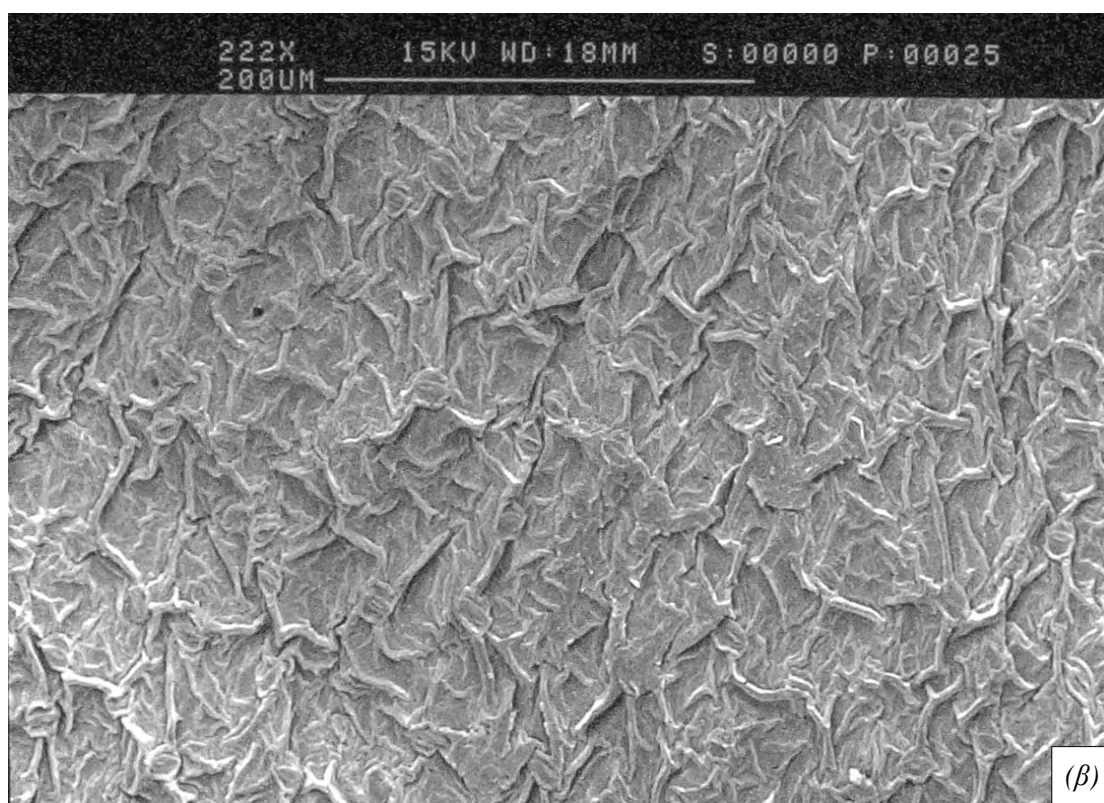
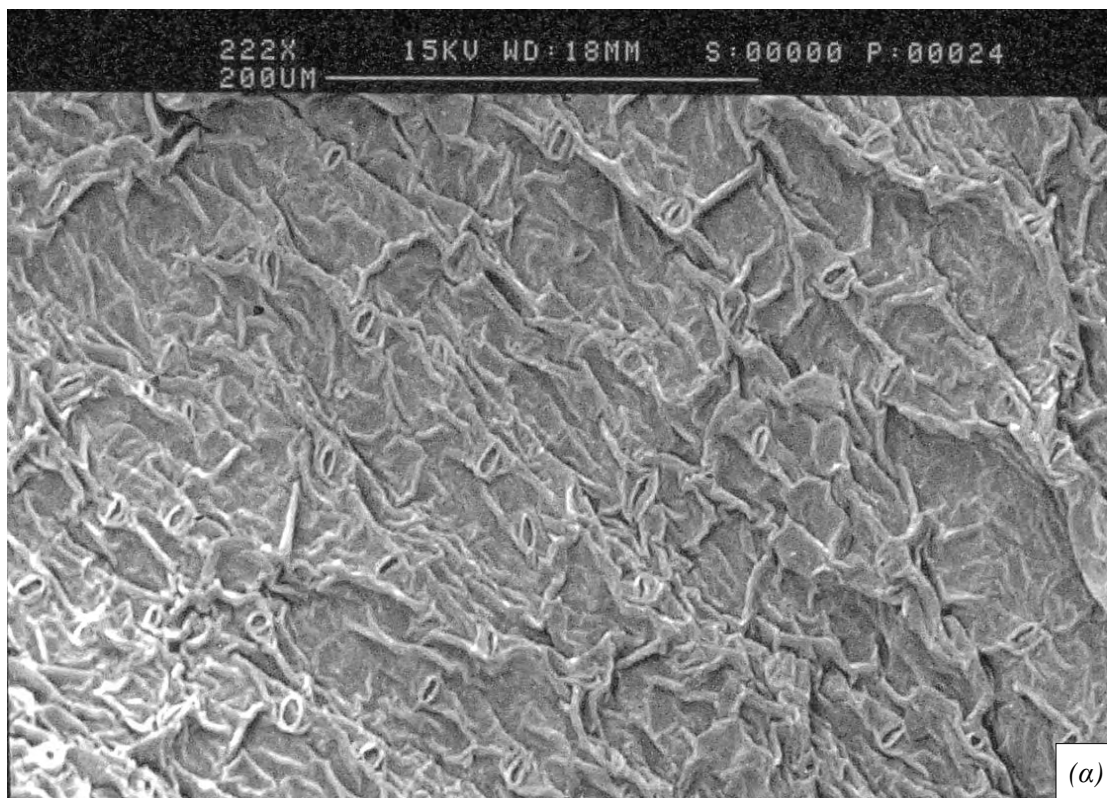


Εικόνα 12. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα ΒΨ. (α) Επάνω επιφάνεια και (β) κάτω επιφάνεια, κλίμακα μπάρας 200μm.

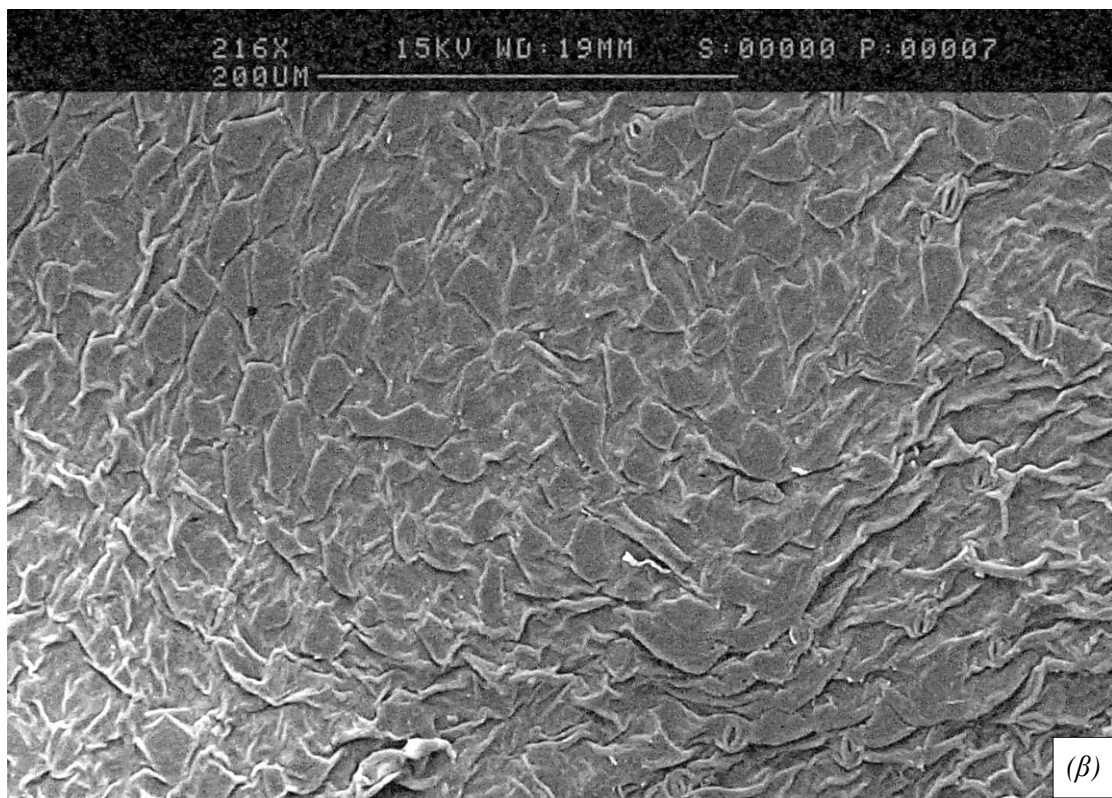
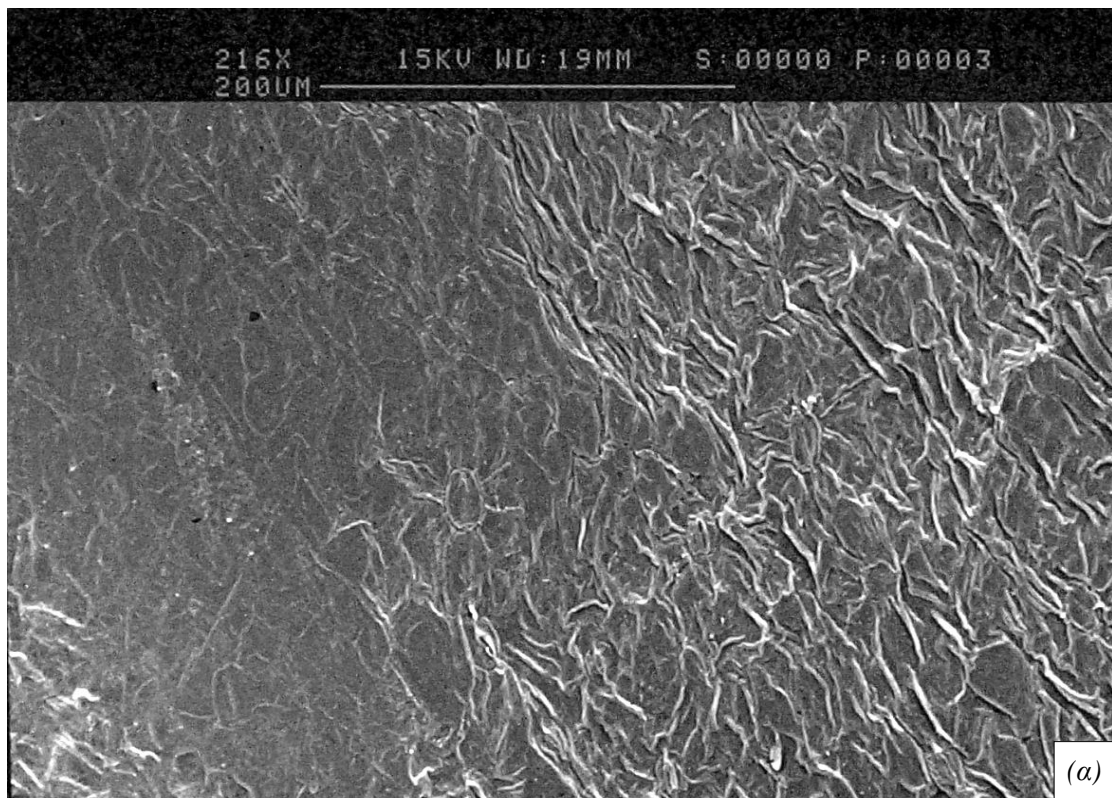


Εικόνα 13. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα ΚΡ. (α) Επάνω επιφάνεια και (β) κάτω επιφάνεια, κλίμακα μπάρας 200μm.



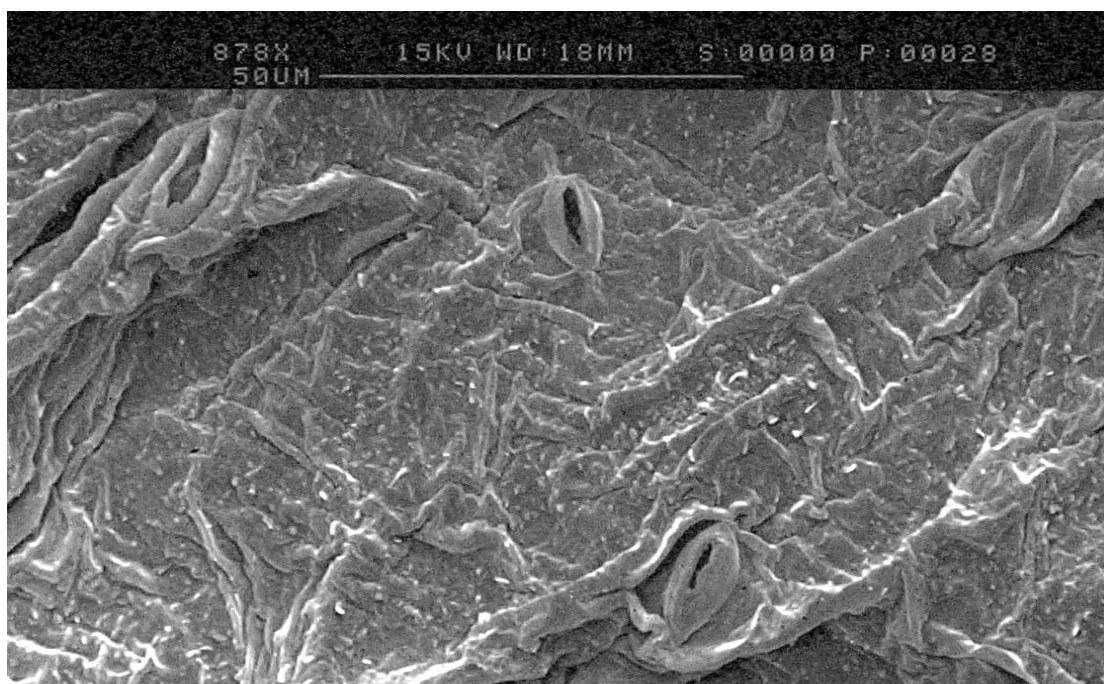


Εικόνα 14. Επιφάνειες με στόματα στην ομάδα ΚΨ. (α) Επάνω επιφάνεια και (β) κάτω επιφάνεια, κλίμακα μπάρας 200μm.

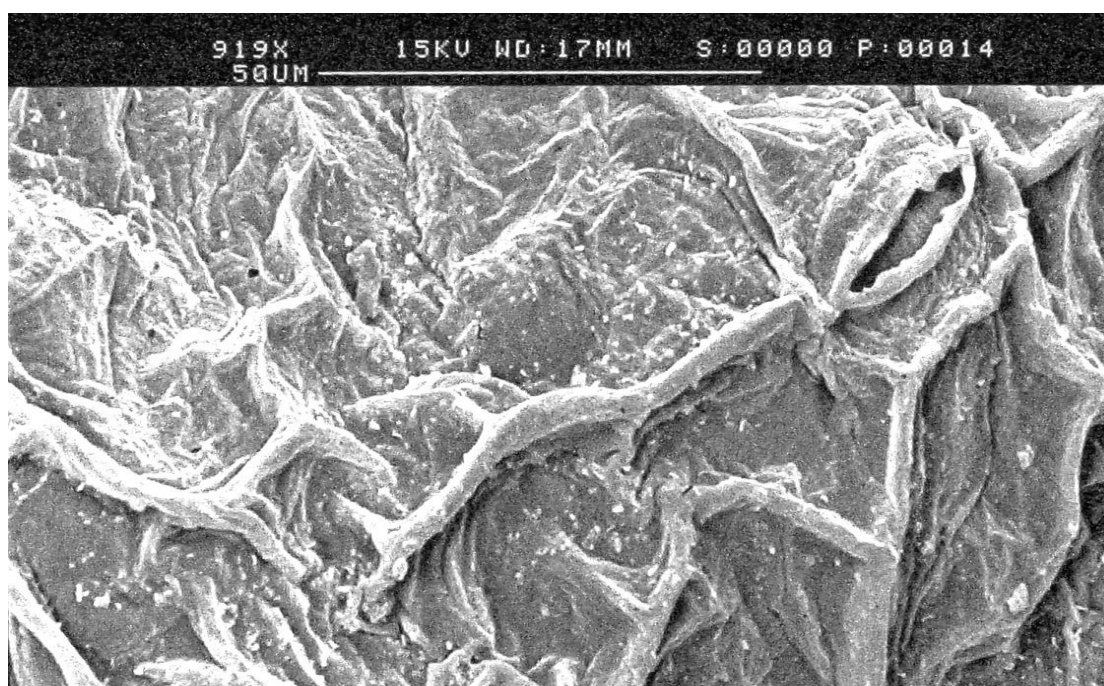


Εικόνα 15. Περιοχές με άλατα στην πάνω επιφάνεια φύλλου (α) της ομάδας BP και (β) της ομάδας BΨ, κλίμακα μπάρας 200μm.



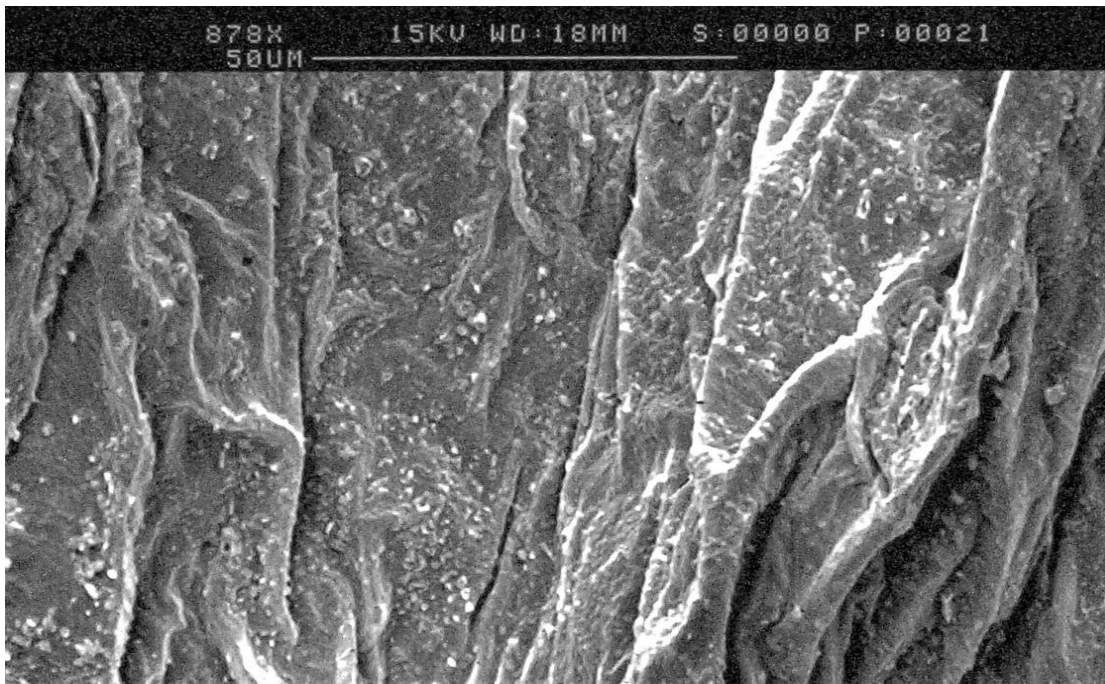


Εικόνα 16. Προσκολλημένα βακτήρια στην πάνω επιφάνεια φύλλου της ομάδας ΚΡ, κλίμακα μπάρας 50μm.

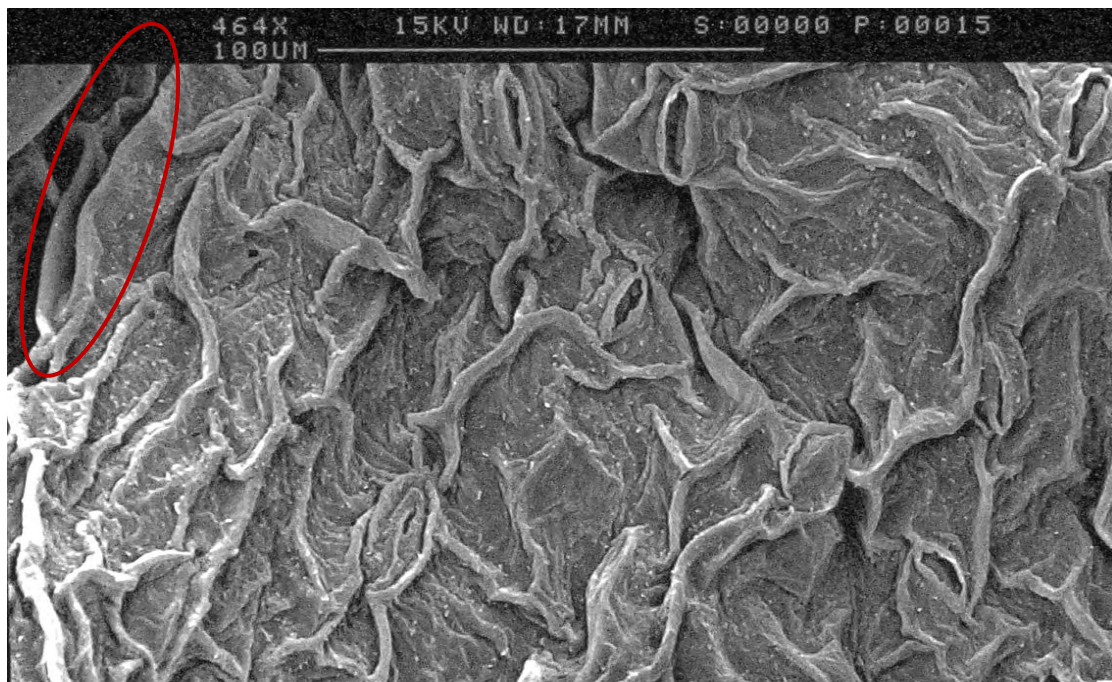


Εικόνα 17. Προσκολλημένα βακτήρια στην ομάδα ΚΨ στην πάνω επιφάνεια φύλλου, κλίμακα μπάρας 50μm.





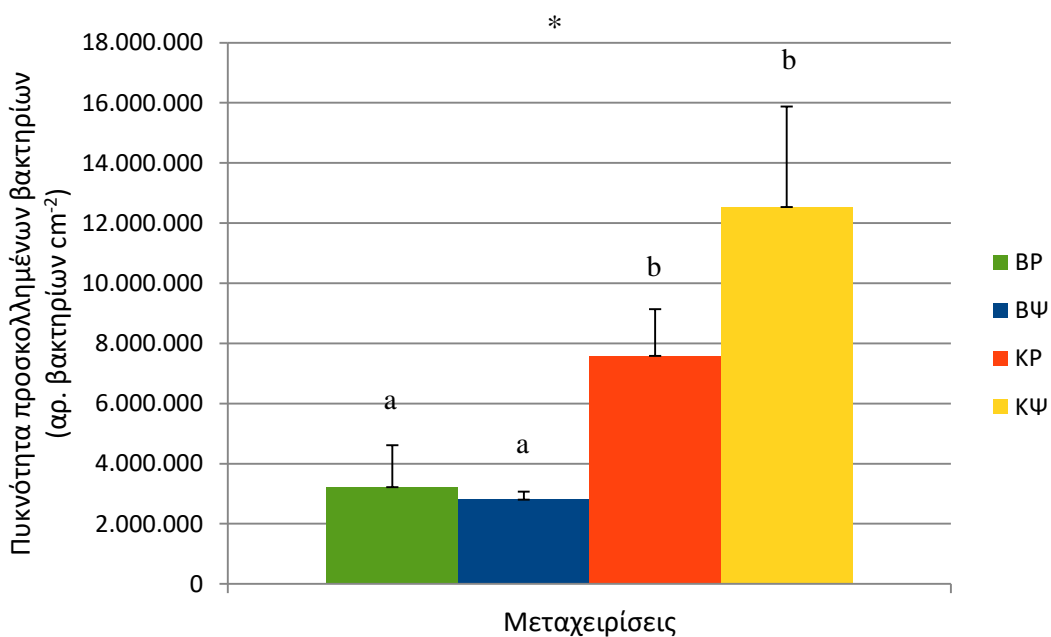
Εικόνα 18. Προσκολλημένα βακτήρια στην κάτω επιφάνεια φύλλου στην ομάδα ΚΨ, κλίμακα μπάρας 50μm.



Εικόνα 19. Προσκολλημένα βακτήρια, στόματα και αλαταδένας (κόκκινο πλαίσιο) στην κάτω επιφάνεια φύλλου στην ομάδα ΚΨ, κλίμακα μπάρας 100μm.

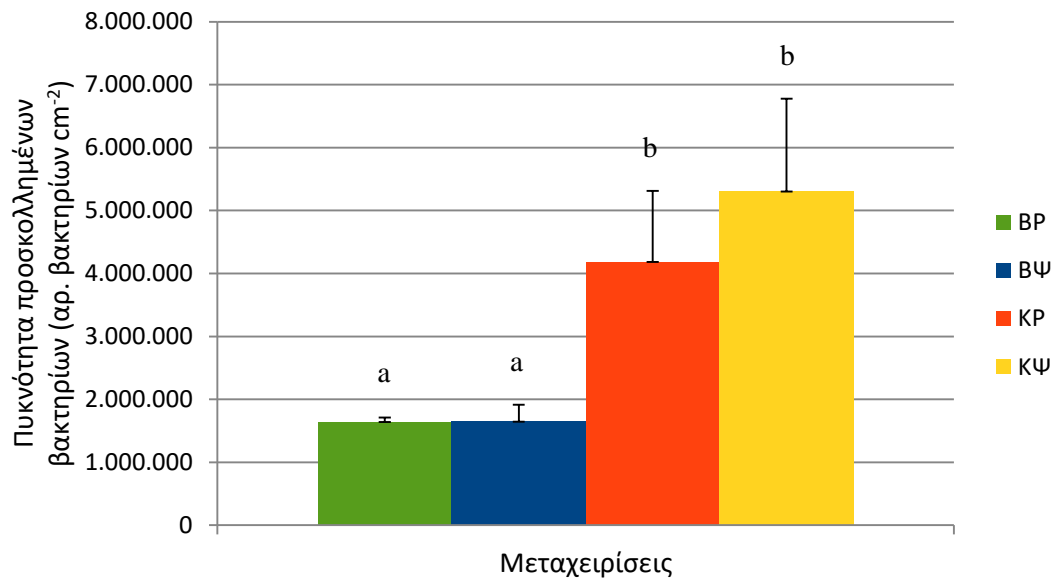


Η βακτηριακή προσκόλληση στα φύλλα των φυτών φαίνεται ότι ήταν σημαντικά εντονότερη στην ομάδα ΚΨ αφού τα βακτήρια εκτιμήθηκαν στα 12,5 εκατομμύρια περίπου ανά  $\text{cm}^2$  στην πάνω και την κάτω επιφάνεια συνολικά. Η πυκνότητα των βακτηρίων στην ομάδα ΚΡ ήταν μικρότερη συγκριτικά με την ομάδα του ψεκασμού ΚΨ εφόσον εκτιμήθηκε ότι είχε 7,6 εκατομμύρια βακτήρια ανά  $\text{cm}^2$ . Οι ομάδες τις βρύσης είχαν σημαντικά λιγότερα βακτήρια, 3,2 και 2,8 εκατομμύρια βακτήρια ανά  $\text{cm}^2$  για τις ομάδες ΒΡ και ΒΨ αντίστοιχα.

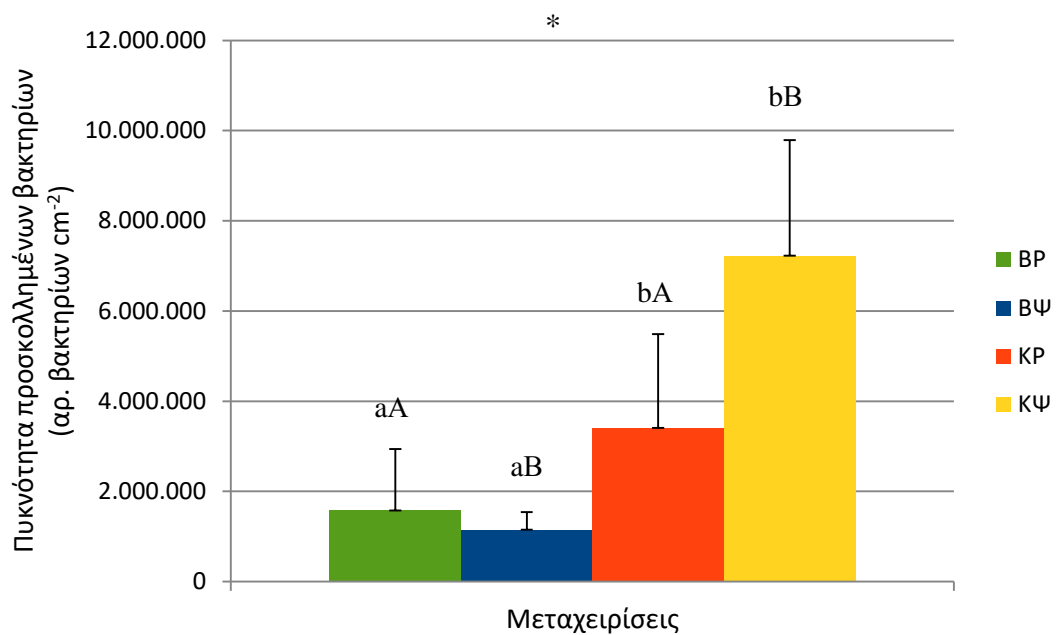


Γράφημα 15. Συνολική βακτηριακή προσκόλληση στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια ανά  $\text{cm}^2$  των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση για  $p < 0,05$ .

Αναλυτικότερα οι πυκνότητες των προσκολλημένων βακτηρίων στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια των φύλλων παρουσιάζονται στα Γραφήματα 16 και 17 αντίστοιχα. Οι δύο ομάδες που ποτίστηκαν με νερό Κάρλας έχουν σημαντικά υψηλότερες τιμές, υποδεικνύοντας επίδραση του είδους του νερού στην πυκνότητα των βακτηρίων. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζεται και για την κάτω επιφάνεια, μόνο που εκεί καταγράφηκε μία στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων του πειράματος, αλλά και του κάθε ενός από αυτούς (Γράφημα 17).



Γράφημα 16. Αριθμός προσκολλημένων βακτηρίων στην πάνω επιφάνεια ανά cm<sup>2</sup> των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού.



Γράφημα 17. Αριθμός προσκολλημένων βακτηρίων στην κάτω επιφάνεια ανά cm<sup>2</sup> των διαφόρων μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή (Μ.Ο.±SD). Τα a και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω του είδους του νερού. Τα A και B υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές λόγω των μεθόδων ποτίσματος. Το \* υποδεικνύει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση για p<0,05.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε ότι η έκθεση του σπανακιού σε αρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες, επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών. Αυτό παρατηρήθηκε από την αρχή του πειράματος, καθώς στην ομάδα της βρύσης τα αρτίβλαστα εμφανίστηκαν πιο γρήγορα, ενώ καταγράφηκε και μεγαλύτερο ποσοστό φύτρωσης σε σχέση με την ομάδα της Κάρλας. Ανάλογα αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στις τελικές μετρήσεις της συνολικής βιομάζας, αλλά και της επιμέρους βιομάζας του υπέργειου και υπόγειου τμήματος του φυτού όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα φυτά της Κάρλας σε σχέση με αυτά της βρύσης. Σε ότι αφορά την επίδραση του ψεκασμού φάνηκε ότι επέφερε μία βελτίωση της εικόνας στα φυτά της Κάρλας, ενώ αντιθέτως τα φυτά του μάρτυρα που ψεκάστηκαν είχαν μειωμένη απόδοση σε σχέση με τα φυτά που έλαβαν νερό της βρύσης με ριζοπότισμα.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης του νερού της Κάρλας συνάδουν με αυτά των Bibo *et al.* (2008), οι οποίοι παρατήρησαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη. Η ελαιοκράμβη (*Brassica napus* L.) και το λάχανο (*Brassica chinensis* L.), για παράδειγμα, αποκρίθηκαν με αύξηση στο νωπό βάρος και στο μήκος των φύλλων σε χαμηλή συγκέντρωση της τοξίνης (0,01 µg/L), ενώ το μέγεθος ριζών και φύλλων μειώθηκε σημαντικά όταν τα φυτά εκτέθηκαν σε 10 µg/L τοξίνης. Οι Chen *et al.* (2004) μελέτησαν τις επιπτώσεις που προκαλεί η χρήση αρδευτικού νερού προερχόμενο από τη λίμνη Dianchi στη νοτιοδυτική Κίνα που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση μικροκυστινών. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ελαιοκράμβη και το ρύζι (*Oryza sativa* L.). Οι μικροκυστίνες ανέστειλαν σημαντικά την επιμήκυνση των κεντρικών ριζών της ελαιοκράμβης και του ρυζιού, όπως και στην παρούσα μελέτη όπου το μέγεθος του ριζικού συστήματος όπως υπολογίστηκε από το ξηρό βάρος ρίζας, στις ομάδες της Κάρλας ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τις ομάδες της βρύσης.

Τα αρνητικά αποτελέσματα της ανάπτυξης των φυτών που εκτέθηκαν στις μικροκυστίνες πιθανώς να σχετίζονται και με το γεγονός ότι η άρδευση με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες πραγματοποιήθηκε από την αρχή της σποράς και η διάρκεια έκθεσης των φυτών σε αυτές ήταν περίπου 90 ημέρες. Οι Bibo *et al.* (2008), αλλά και οι Levizou *et al.* (2017) αναφέρουν ότι η υψηλή ευαισθησία των φυτών στις μικροκυστίνες εξαρτάται από το βλαστικό στάδιο των φυτών, το είδος των φυτών και τη διάρκεια έκθεσης μέσω της άρδευσης. Φαίνεται ότι τα αποτελέσματα των μικροκυστινών είναι ισχυρά δοσο-εξαρτώμενα, άρα οι καλλιέργειες με χαμηλή συχνότητα άρδευσης μπορεί να υποστούν μικρότερες σε σχέση με τις υδρόβιες καλλιέργειες και τις καλλιέργειες με υψηλή συχνότητα άρδευσης.

Στην παρούσα έρευνα, ενδιαφέρουσα απόκριση καταγράφηκε ως προς τις συγκεντρώσεις κάποιων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Οι ομάδες της Κάρλας εμφάνισαν αύξηση των χλωροφυλλών αλλά και των καροτενοειδών σε σχέση με τις ομάδες της βρύσης, με τις διαφορές στη χλωροφύλλη α και το λόγο χλωροφύλλες/καροτενοειδή να είναι στατιστικά σημαντικές. Σύμφωνα με τους Levizou *et al.* (2017) ανάλογη εικόνα καταγράφηκε στο μαρούλι (*Lactuca sativa* L.). Τα φυτά που έλαβαν νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες από τη λίμνη Κάρλα από το στάδιο της σποράς παρουσίασαν υψηλότερη φωτοσυνθετική ικανότητα, χλωροφύλλη και περιεκτικότητα σε άζωτο σε σχέση με τα φυτά που λάμβαναν νερό βρύσης.

Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις κατέδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στην πυκνότητα και το μέγεθος των στομάτων. Στην πάνω επιφάνεια παρουσιάστηκε μία τάση για περισσότερα και μικρότερα στόματα στην ομάδα ΚΡ σε σχέση τόσο με την ομάδα ΒΡ όσο, και κυρίως, με την ΚΨ, η οποία είχε τα λιγότερα και μεγαλύτερα στόματα στην πάνω επιφάνεια. Ένα άλλο πρότυπο φάνηκε στην κάτω επιφάνεια όπου είχαμε σημαντικά λιγότερα στόματα στα φυτά της Κάρλας και μέσα στις δύο ομάδες Κάρλας και Βρύσης, τα φυτά που ποτίστηκαν στη ρίζα είχαν λιγότερα. Η σειρά λοιπόν μειούμενης πυκνότητας στομάτων για την κάτω επιφάνεια του φύλλου ήταν ΒΨ>ΒΡ>ΚΨ>ΚΡ. Αντίστοιχες μελέτες δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία. Εντούτοις, αποτελέσματα της πρώτης μελέτης για τις πιθανές επιπτώσεις του ψεκασμού με νερό που περιέχει μικροκυστίνες (Abe *et al.*, 1996) ίσως να σχετίζονται με το παραπάνω πρότυπο εάν η παρεμπόδιση της φωτοσύνθεσης που καταγράφηκε στο φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) μετά από πολλαπλές τοπικές εφαρμογές (εμβάπτιση) μικροκυτίνης-LR σε συγκέντρωση 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  σχετίζεται με μειωμένο αριθμό στομάτων.

Σύμφωνα με τις φωτογραφίες (Εικόνες 16 έως 19) από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης παρατηρήθηκαν προσκολλημένα βακτήρια στις επιφάνειες των φύλλων τόσο στην πάνω όσο και στην κάτω επιφάνεια. Η πυκνότητα των βακτηριών ήταν σημαντικά υψηλότερη στα φυτά της Κάρλας, με τα ΚΨ να υπερέχουν πολύ. Χαρακτηριστικό είναι ότι ενώ τα φυτά που ποτίστηκαν στη ρίζα, τα ΚΡ είχαν δύο φορές περισσότερα βακτήρια και στην πάνω και στην κάτω επιφάνεια του φύλλου από τα ΒΡ, η αύξηση στα ΚΨ κυμάνθηκε από δύο φορές στην πάνω επιφάνεια έως 6 φορές στην κάτω σε σχέση με τα ΒΨ. Οι μετρήσεις σε επίπεδο φύλλου έφτασαν τα 12,5 εκ. βακτήρια στη μονάδα της επιφάνειας για τα ΚΨ, τα 7,5 εκ. στα ΚΡ και περίπου στα 3 εκ. για τις δύο ομάδες της βρύσης. Τα βακτήρια που παρατηρήθηκαν στις ομάδες της βρύσης μπορεί να αερομεταφέρθηκαν μέσω του ψεκασμού των φυτών ή να είναι βακτήρια που υπάρχουν στον αέρα. Με την συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για το είδος των βακτηρίων που υπήρχαν, εντούτοις στο νερό της λίμνης

Κάρλα έχουν ανιχνευτεί υψηλές συγκεντρώσεις ετερότροφων βακτηρίων που πιθανόν να προσκολλήθηκαν και στα φύλλα του σπανακιού κατά την άρδευση των αντίστοιχων φυτών.

Οι Codd *et al.* (1999) έκαναν μικροσκοπική παρατήρηση σε μαρούλι που ποτίστηκε με μορφή ψεκασμού με νερό που περιείχε κυανοτοξίνες. Παρατήρησαν ύπαρξη αποικιών ή μεμονωμένα κύτταρα του είδους *Microcystis aeruginosa* και εντόπισαν την ηπατοτοξική μικροκυστίνη σε βρώσιμο μέρος των μαρουλιών. Η συγκεκριμένη μελέτη με χημική ανάλυση έδειξε ότι οι τοξίνες απορροφήθηκαν από τα φυτά και τα κεντρικά φύλλα είχαν προστατευτεί από την άρδευση σε σχέση με τα εξωτερικά. Επίσης, τα κυανοβακτήρια δεν απομακρύνθηκαν με έκπλυση των φύλλων στο νερό. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το είδος *Spinacia oleracea* λόγω της μορφολογικής διάταξης των φύλλων (σχήμα ροζέτας) ώστε τα αποτελέσματα στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του υπέργειου μέρους και στην προσκόλληση των βακτηρίων να είναι περισσότερο εμφανή αποφεύγοντας τυχόν διαφοροποιήσεις στα εσωτερικά και εξωτερικά φύλλα από την διαδικασία του ψεκασμού με το αρδευτικό νερό από τη λίμνη Κάρλα.

Σε μία άλλη έρευνα των Hereman και Bittencourt-Oliveira (2012) μελετήθηκε η μόλυνση του μαρουλιού (*Lactuca sativa* L.) από ακατέργαστα εκχυλίσματα που προέρχονται από νερό με μικροκυστίνη από το *Microcystis aeruginosa*. Οι μικροκυστίνες βρέθηκαν σε ιστούς φυλλώματος μαρουλιού σε όλες τις συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων σε επίπεδα υψηλότερα από την ημερήσια πρόσληψη μικροκυστίνης που συνιστά ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας.

Τέλος, υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία μία έρευνα όπου διερευνήθηκαν οι επιδράσεις του ακατέργαστου εκχυλίσματος κυανοβακτηρίων (που περιέχει μικροκυστίνη-LR) στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία των διαφορετικών ποικιλιών σπανακιού (*Spinacia oleracea*) (Pflugmacher *et al.*, 2007). Η έμφαση σε αυτή την εργασία δόθηκε στις αντιοξειδωτικές αποκρίσεις του σπανακιού, όπου παρατήρησαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών σε συγκεντρώσεις γλουταθειόνης, ασκορβικού και τοκοφερόλης με την έκθεση σε τοξίνες. Έτσι εκτός από τις σοβαρές μορφολογικές επιδράσεις - που εν πολλοίς συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής - όπως η αναστολή της ανάπτυξης παρατηρήθηκε η δημιουργία οξειδωτικού στρες σε κυτταρικό επίπεδο.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών καταγράφηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τα αρτίβλαστα εμφανίστηκαν νωρίτερα και επετεύχθη μεγαλύτερο ποσοστό φυτρωτικότητας στην ομάδα της Βρύσης σε σχέση με την ομάδα της Κάρλας. Επιπλέον, υψηλότερες τιμές των διαφόρων αναπτυξιακών παραμέτρων εμφάνισαν τα φυτά της βρύσης σε σχέση με τα φυτά που εκτέθηκαν στο νερό της Κάρλας. Ο ψεκασμός ως μέθοδος ποτίσματος φάνηκε να ωφέλησε την ανάπτυξη της αντίστοιχης ομάδας στην περίπτωση της Κάρλας, αλλά όχι την ομάδα που ψεκάστηκε με νερό βρύσης. Έτσι το πρότυπο που αποτυπώθηκε στην ανάπτυξη ήταν  $BP > B\Psi > K\Psi > KP$ , η ομάδα δηλαδή που εμφάνισε την μικρότερη ανάπτυξη ήταν η ομάδα όπου η χορήγηση του νερού Κάρλας έγινε στη ρίζα.

Οι ομάδες που ποτίστηκαν με νερό Κάρλας (KP και KΨ) εμφάνισαν σημαντική αύξηση της χλωροφύλλης *a* και του λόγου χλωροφύλλες/καροτενοειδή σε σχέση με τις ομάδες της βρύσης. Το σύστημα ποτίσματος (ριζοπότισμα ή ψεκασμός) φαίνεται ότι επηρέασε μόνο τη μέτρηση των ολικών φαινολικών καθώς οι ομάδες που ποτίστηκαν στην ρίζα (BP και KP) εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη συγκεντρώση ολικών φαινολικών σε σχέση με τις ομάδες που η χορήγηση του νερού έγινε με ψεκασμό (BΨ και KΨ).

Η πυκνότητα των στομάτων παρουσίασε διαφορετικό πρότυπο για την πάνω και κάτω επιφάνεια του φύλλου. Στην πάνω επιφάνεια υπήρχε τάση για περισσότερα και μικρότερα στόματα στο KP σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Στην κάτω επιφάνεια οι ομάδες της Βρύσης είχαν περισσότερα στόματα, ενώ οι δομές αυτές σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν παρόμοιου μεγέθους.

Προσκολλημένα βακτήρια παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σε όλες τις ομάδες του πειράματος αλλά σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις (2-6 φορές) καταγράφηκαν στην ομάδα της Κάρλας. Τα βακτήρια στην ομάδα KP ήταν λιγότερα συγκριτικά με τα βακτήρια στην ομάδα του ψεκασμού όπως ήταν αναμενόμενο.

Καταληκτικά, η χρήση αρδευτικού νερού με υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχει αρνητικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των φυτών, επηρεάζει σημαντικά τα ανατομικά τους χαρακτηριστικά, ενώ προκαλεί τη συσσώρευση αυξημένων ποσοτήτων βακτηρίων στο βρώσιμο ιστό. Ο ψεκασμός με νερό Κάρλας βελτιώνει ελαφρώς κάποιες αναπτυξιακές παραμέτρους σε σχέση με το ριζοπότισμα - χωρίς σημαντικό όφελος για το φυτό, αντιθέτως όμως επιβαρύνει πολύ τον βρώσιμο ιστό με αυξημένες συγκεντρώσεις βακτηρίων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική

Παπαδημητρίου Θ. (2010) Επιπτώσεις των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε υδρόβιους μικροοργανισμούς. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Διδακτορική Διατριβή.

### Ξενόγλωσση

Abe, T., Lawson, T., Weyers, J. D., & Codd, G. A. (1996). Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist*, 133(4), 651-658.

Aboal, M., & Puig, M. Á. (2005). Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*, 45(4), 509-518.

Ananiadis, C.I. (1956). Limnological study of Lake Karla, Bulletin de l'Institut Oc'eanographique, Vol. 1083, pp. 1-19.

Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in microbiology*, 154(3), 157-164.

Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., & Yongding, L. (2008). A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *Journal of environmental management*, 86(3), 566-574.

Bryant, D. A. (Ed.). (2006). *The molecular biology of cyanobacteria* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

Chamoglou, M., Papadimitriou, T., & Kagalou, I. (2014). Key-descriptors for the functioning of a Mediterranean reservoir: the case of the New lake Karla-Greece. *Environmental Processes*, 1(2), 127-135.

Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., & Liu, Z. (2004). Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon*, 43(4), 393-400.

Chen, J., Dai, J., Zhang, H., Wang, C., Zhou, G., Han, Z., & Liu, Z. (2010). Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology*, 19(4), 796-803.

Chorus, I. and Cavalieri, M. (2000). Monitoring Bathing Waters - A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes, Chapter 10: CYANOBACTERIA AND ALGAE, World Health Organization (WHO)

Codd, G. A., Ward, C. J., & Bell, S. G. (1997). Cyanobacterial Toxins: Occurrence, Modes of Action, Health Effects and Exposure. In *Applied Toxicology: Approaches Through Basic Science: Proceedings of the 1996 EUROTOX Congress Meeting Held in Alicante, Spain, September 22–25, 1996* (Vol. 19, p. 399). Springer.

Codd, G. A., Metcalf, J. S., & Beattie, K. A. (1999). Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, 37(8), 1181-1185.

Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., (2014). Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1–15.

Crush, J. R., Briggs, L. R., Sprosen, J. M., & Nichols, S. N. (2008). Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environmental toxicology*, 23(2), 246-252.

de Figueiredo, D. R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonçalves, F. J., & Pereira, M. J. (2004). Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(2), 151-163.

Dodds, W. K., Gudder, D. A., & Mollenhauer, D. (1995). The ecology of *Nostoc*. *Journal of Phycology*, 31(1), 2-18.

Fitzgerald, D. J. (2001). Cyanotoxins and human health—overview. *Cyanotoxins Occurrence, Causes, Consequences*, 179-89.

Gialis, S., & Laspidou, C. S. (2014). Lake Karla and the contradictory character of Greek environmental policies: a brief historical overview. In *IWA-regional symposium on water, wastewater and environment* (pp. 22-24).

Gkelis, S., Panou, M., Chronis, I., Zervou, S.K., Christophoridis, C., Manolidi, K., Ntislidou, C., Triantis, C.M., Kaloudis, T., Hiskia, A., Kagalou, I., & Lazaridou, M. (2017). Monitoring a newly re-born patient: water quality and cyanotoxin occurrence in a reconstructed shallow Mediterranean lake. *Advances in Oceanography and Limnology*, 8(1), 33-51.



- Gutu, A., & Kehoe, D. M. (2012). Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. *Molecular plant*, 5(1), 1-13.
- Hamvas, M., Máthé, C., Vasas, G., Jámbrík, K., Papp, M., Beyer, D. & Borbély, G. (2010). Cyindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis. *Acta Biologica Hungarica*, 61(Supplement 1), 35-48.
- Hereman, T. C., & Bittencourt-Oliveira, M. D. C. (2012). Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *Journal of phycology*, 48(6), 1535-1537.
- Kormas, K. A., Meziti, A., & Papadimitriou, T. (2015). Microbiological Confinement of Two Adjacent Water Wells in Lake Karla Basin, Greece. *Water*, 7(10), 5272-5283.
- Kos, P., Gorzo', G., Sura'nyi, G., Borbe'ly, G., (1995). Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal. Biochem.* 225, 49–53.
- Levizou, E., Statiris, G., Papadimitriou, T., Laspidou, C. S., & Kormas, K. A. (2017). Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 193-200.
- McElhiney, J., Lawton, L. A., & Leifert, C. (2001). Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*, 39(9), 1411-1420.
- Mellios, N., Kofinas, D., Laspidou, C., & Papadimitriou, T. (2015). Mathematical modeling of trophic state and nutrient flows of Lake Karla using the PCLake model. *Environmental Processes*, 2(1), 85-100.
- Nikouli, E., Kormas, K. A., Berillis, P., Karayanni, H., & Moustaka-Gouni, M. (2013). Harmful and parasitic unicellular eukaryotes persist in a shallow lake under reconstruction (L. Karla, Greece). *Hydrobiologia*, 718(1), 73-83.
- Oikonomou, A., Katsiapi, M., Karayanni, H., Moustaka-Gouni, M., & Kormas, K. A. (2012). Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *The Scientific World Journal*, 2012.

- Papadimitriou, T., Katsiapi, M., Kormas, K. A., Moustaka-Gouni, M., & Kagalou, I. (2013). Artificially-born “killer” lake: phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. *Science of the total environment*, 452, 116-124.
- Papadimitriou, T., Kormas, K., Dionysiou, D. D., & Laspidou, C. (2016). Using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments for the degradation of cyanobacteria and microcystins in a shallow hypertrophic reservoir. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 21523-21535.
- Peuthert, A., Pflugmacher, S. (2010). Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfalfa seedlings (*Medicago sativa*). *Toxicon* 56, 411–417.
- Pichardo, S., Pflugmacher, S., (2011). Study of the antioxidant response of several bean variants to irrigation with water containing MC-LR and cyanobacterial crude extract. *Environ Toxicol* 26, 300–306.
- Rinta-Kanto, J. M., Konopko, E. A., DeBruyn, J. M., Bourbonniere, R. A., Boyer, G. L., & Wilhelm, S. W. (2009). Lake Erie Microcystis: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae*, 8(5), 665-673.
- Rodriguez, S., Gonzales, K. N., Romero, E. G., Troncoso, O. P., & Torres, F. G. (2017). Unusual reversible elastomeric gels from *Nostoc commune*. *International journal of biological macromolecules*, 97, 411-417.
- Saqrane, S., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V. (2008). Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Health. B.* 43, 443–451.
- Sidiropoulos, P., Papadimitriou, T., Stabouli, Z., Loukas, A., Mylopoulos, N., & Kagalou, I. (2012). Past, present and future concepts for conservation of the re-constructed Lake Karla (Thessaly-Greece). *Fresenius Environ. Bull*, 21, 3027-34.
- Smith, J. L., Schulz, K. L., Zimba, P. V., & Boyer, G. L. (2010). Possible mechanism for the foodweb transfer of covalently bound microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 757-761.
- USEPA, (2001). Creating a cyanotoxin target list for the unregulated contaminant monitoring rule. United States Environmental Protection Agency Meeting, 17–18 of May 2001, Cincinnati, USA.

Watanabe, M. F., Tsuji, K., Watanabe, Y., Harada, K. I., & Suzuki, M. (1992). Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Natural toxins*, 1(1), 48-53.

Whitton, B. A., & Potts, M. (Eds.). (2007). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Springer Science & Business Media.

WHO, (1998). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1998.

WHO, (2003). Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 136–158.

### **Ηλεκτρονική**

[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=30050](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=30050)

<http://www.algalweb.net/search6.htm>

<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxins/microcystins.html>

<http://www.noaanews.noaa.gov/stories2015/20150709-noaa-partners-predict-severe-harmful-algal-bloom-for-lake-erie.html>